

Identifizierung und Charakterisierung des Mais-spezifischen Signalpeptids Zip1 und dessen Aktivierung durch Cysteinproteasen



Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sebastian Ziemann
aus Plettenberg (Sauerland)

Köln, 2017

Identifizierung und Charakterisierung des Mais-spezifischen Signalpeptids Zip1 und dessen Aktivierung durch Cysteinproteasen

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sebastian Ziemann
aus Plettenberg (Sauerland)

Köln, 2017

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2012 bis November 2014 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen in Marburg und von Dezember 2014 bis Mai 2017 am Lehrstuhl für Terrestrische Mikrobiologie an der Universität zu Köln unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Gunther Döhlemann durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am:

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Gunther Döhlemann
Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Regine Kahmann

Tag der mündlichen Prüfung:

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Ziemann S., Linde K., Lahrmann U., Acar B., Kaschani F., Colby T., Kaiser M., Ding Y., Schmelz E., Holton N., Zipfel C. and Doehlemann G. (2017). Production of a plant immune signaling peptide by apoplastic papain-like cysteine proteases. *Submitted*.

Weitere Veröffentlichungen:

Christensen, S.A., Huffaker, A., Kaplan, F., Sims, J., **Ziemann, S.**, Doehlemann, G., Ji, L., Schmitz, R.J., Kolomiets, M.V., Alborn, H.T., Morii N., Janderj G., Nik X., Sartorb R.C., Byersl S., Abdol Z., and Schmelz E.A. (2015). Maize death acids, 9-lipoxygenase-derived cyclopente(a)nones, display activity as cytotoxic phytoalexins and transcriptional mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11407–11412, doi: 10.1073/pnas.1511131112

Mueller, A.N., **Ziemann, S.**, Treitschke, S., Aßmann, D. und Doehlemann, G. (2013). Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathog* 9: e1003177.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „**Identifizierung und Charakterisierung des Mais-spezifischen Signalpeptids Zip1 und dessen Aktivierung durch Cysteinproteasen**“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Sebastian Ziemann)

“Penicillin cures, but wine makes people happy.”

Alexander Flemming.

Zusammenfassung

Während ihrer Entwicklung haben Pflanzen mit einer hohen Vielfalt von Pathogenen zu kämpfen. Pflanzen wirken einem Pathogenbefall entgegen, indem sie abhängig vom Lebensstils des Pathogens eine entgegengesetzte Immunreaktion, Zelltod oder Zellüberleben, induzieren. In diesem Zusammenhang spielen Papain-ähnliche Cysteinproteasen (PLCPs) eine entscheidene Rolle bei der Regulation der pflanzlichen Immunantwort und der Einleitung des Zelltods. In Mais (*Zea mays*) konnten fünf apoplastische PLCPs (CP1A, CP1B, CP2, XCP2 und CatB) identifiziert werden, die für diesen Prozess und die Inszenierung der Salicylsäure (SA)-abhängigen Immunantwort entscheidend sind. Interessanterweise ist das Zusammenspiel von PLCPs und SA-Immunreaktionen nicht linear, sondern zeigt eine reziproke Amplifikation. Im Gegensatz zu phänotypischen Beobachtungen sind die zugrundeliegenden, biochemischen Mechanismen weitgehend unerforscht. In dieser Arbeit konnte mittels massenspektrometrischer Analysen und Bioassays ein Peptid in SA-behandelten Maisblättern identifiziert werden, dass als Zip1 (*Zea mays immune signaling peptide 1*) bezeichnet wurde. Zip1 induziert die Expression SA-assoziiierter *PR* (*pathogenesis-related*)-Gene und aktiviert, ähnlich wie SA, apoplastische PLCPs. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass zwei der zuvor identifizierten PLCPs, CP1 und CP2, immunogene Peptidsignale aus dem Zip1-Vorläuferprotein (PROZIP1) proteolytisch freisetzen. Weiterhin bestätigen RNAseq-basierte Transkriptomanalysen, dass Zip1- und SA-behandelte Maisblätter einen Großteil ähnlicher Immunantworten auf Transkriptebeine teilen, weshalb bei Zip1 von einem SA-analogen Signalpeptid gesprochen werden kann. Bemerkenswerterweise und mit den RNAseq-Daten einhergehend konnte außerdem gezeigt werden, dass Zip1 die *de novo* Synthese von SA induziert. Darauf aufbauend erhöht Zip1 die Suszeptibilität von Mais gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *Botrytis cinerea*. Mit der Identifizierung von Zip1, einem endogenen Maispeptid, welches von SA-aktivierten PLCPs freigesetzt wird, ist das erste pflanzliche Peptidsignal charakterisiert worden, das an der SA-abhängigen Immunantwort und dessen sequentiellen Amplifikation beteiligt ist.

Summary

During their development plants face a wide range of pathogens. Control of plant pathogen resistance or susceptibility depends on the lifestyle of the invader and the promotion of either cell survival or cell death. Papain-like cysteine proteases (PLCPs) play important roles in regulating plant defense responses and in protecting plants against biotrophic pathogens. In maize (*Zea mays*) a set of five PLCPs, namely CP1A, CP1B, CP2, XCP2 and CatB, is critical in the orchestration of salicylic acid (SA)-dependent signaling. Intriguingly, the interaction of PLCPs and SA signaling pathways are non-linear and display patterns of reciprocal amplification. Underlying biochemical mechanisms by which PLCPs promote SA-associated defense responses remain unknown. In this work a peptide in apoplastic fluid of SA treated leaves termed Zip1 (*Z*ea *m*ays immune signaling peptide 1) was identified by using mass spectrometry and maize leaf bioassays. Zip1 induces maize *PR*-gene expression and activates apoplastic PLCPs similar to SA. *In vitro* studies using recombinant proteins demonstrate that CP1 and CP2 release immunogenic peptide signals from the propeptide precursor PROZIP1. Furthermore, RNAseq-based transcriptome analyses in maize leaves revealed that Zip1 treatment almost completely resembles SA defense responses. In line with that, Zip1 treatment results in *de novo* synthesis of SA. In the context of a necrotrophic fungal pathogen (*Botrytis cinerea*), Zip1 promotes disease susceptibility towards maize. Zip1, an endogenous plant peptide released by PLCPs, is the first immunogenic peptide, which acts sequentially as an amplifier of SA-dependent defense signaling in maize.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Avr-Protein	Avirulenzprotein
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CatB	CathepsinB
CC9	<i>Corn Cystatin 9</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CERK1	<i>Chitin receptor kinase 1</i>
Clm	Chloramphenicol
Co-Ip	Co-Immunopräzipitation
CP	<i>cysteine protease</i>
Cys	Cystein
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGB	Early Golden Bantam
engl.	englisch
elf18	18 AS-Epitop des <i>Elongation factor TU</i>
EFR	<i>EF-Tu Rezeptor</i>
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i>
Et	<i>ethylene</i>
flg22	22 AS-Epitop von Flagellin
FLS2	<i>FLAGELLIN SENSING 2</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm
<i>g</i>	Fallbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hemagglutinin
His	Histidin
hpi	<i>hours post infiltration/inoculation</i>
HR	hypersensitive Reaktion
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JA	<i>jasmonic acid</i>
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
lat.	lateinisch
Leu	Leucin

LRR	<i>leucin rich repeat</i>
LysM	Lysin-Motiv
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MAMP	<i>microbe associated molecular pattern</i>
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NB-LRR	<i>nucleotide binding leucin rich repeat</i>
nm	Nanometer
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
OD	optische Dichte
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pit	<i>Protein(s) important for tumors</i>
PLCP	<i>Papaine like cysteine protease</i>
PR	<i>pathogenesis related</i>
PRR	<i>pathogen recognition rezeptor</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
Rif	Rifampicin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
R-Protein	Resistenzprotein
RT	Raumtemperatur
SA	<i>salicylic acid</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde
SP	Signalpeptid
Strep	Streptavidin
Tab.	Tabelle
Trp	Tryptophan
u. a.	unter anderem
ün	über Nacht
vgl.	vergleiche
VIGS	Virus-induziertes Gen- <i>silencing</i>
XCP2	<i>xyleme cysteine protease 2</i>
z.B.	zum Beispiel
Zip1	<i>Zea mays immune signaling peptide 1</i>
ZIPR1	<i>Zip1-Receptor1</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungen und Fachbegriffe.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Das pflanzliche Immunsystem.....	1
1.2 Phytohormone im Netzwerk des pflanzlichen Immunsystems	6
1.3 Pflanzliche Signalpeptide	10
1.4 Die Bedeutung von Cysteinproteasen bei der Pflanzenabwehr	14
1.5 <i>Zea mays</i> – Kulturpflanze und Modellorganismus.....	16
1.6 Die Rolle von PLCPs in der Immunantwort von Mais.....	17
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	19
2 Ergebnisse	20
2.1 Induktion SA-assoziiierter <i>PR</i> -Genexpression durch Peptide im apoplastischen Fluid	20
2.2 Identifizierung eines apoplastischen Signalpeptids.....	21
2.2.1 Die biologische Aktivität von Zip1 ist Sequenz-spezifisch.....	22
2.3 Untersuchung Zip1-abhängiger Abwehrreaktionen	24
2.3.1 Zip1 aktiviert apoplastische PLCPs	24
2.3.2 Zip1 induziert keine PTI-abhängigen Immunreaktionen	25
2.4 Biochemische Untersuchung von PROZIP1	27
2.4.1 Aufreinigung von PROZIP1 und PROZIP1-Varianten.....	28
2.4.2 SA-aktivierte Mais PLCPs prozessieren PROZIP1	29
2.4.3 Die Prozessierung von PROZIP1 durch PLCs setzt aktives Zip1 frei..	31

2.5	Zip1 fungiert als vollständiges SA-Signal	33
2.5.1	Transkriptionsanalyse SA- und Zip1-behandelter Maisblätter	33
2.5.2	Zip1 induziert <i>de novo</i> Synthese von SA	38
2.5.3	Zip1 erhöht die Suszeptibilität gegenüber <i>Botrytis cinerea</i>	38
2.6	Identifizierung eines möglichen Zip1-Rezeptors.....	40
3	Diskussion	43
3.1	Identifizierung eines Mais-spezifischen Peptidhormons.....	44
3.1.1	Die biologische Aktivität von Zip1 ist Sequenz-spezifisch.....	45
3.2	Zip1, ein neues SA-Signal in <i>Zea mays</i>	46
3.3	SA-aktivierte PLCPs setzen aktives Zip1 frei	51
3.4	Der pflanzliche Zip1-Rezeptor.....	53
3.5	Model zur Zip1-abhängigen Immunantwort in <i>Zea mays</i>	56
3.6	Ausblick.....	58
4	Material und Methoden	61
4.1	Material und Bezugsquellen	61
4.1.1	Chemikalien.....	61
4.1.2	Puffer und Lösungen	61
4.1.3	Enzyme und Antikörper	61
4.1.4	Verwendete Kits und sonstiges Material.....	61
4.2	Zellkultivierung	62
4.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	62
4.2.2	Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
4.2.3	Kultivierung von <i>Botrytis cinerea</i>	63
4.2.4	Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen.....	63
4.3	Stämme, Vektoren, Oligonukleotide und Peptide.....	64
4.3.1	<i>Escherichia coli</i>	64
4.3.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64

4.3.3	Botrytis cinerea	64
4.3.4	Plasmide	65
4.4	Molekularbiologische Standardmethoden	69
4.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	69
4.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Maisblättern	69
4.4.3	<i>In vitro</i> Modifikationen von Nukleinsäuren	70
4.4.4	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	71
4.4.5	Aufreinigung von Nukleinsäuren	72
4.4.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	72
4.4.7	PCR-Ansatz mit Phusion-Polymerase	72
4.4.8	PCR-Ansatz mit GoTaq® Green Master Mix	73
4.4.9	PCR-Ansatz mit KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase	73
4.4.10	cDNA Synthese	73
4.4.11	Quantitative <i>real-time</i> PCR	73
4.4.12	Sequenzierung von Nukleinsäuren	74
4.5	RNAseq	74
4.6	Mikrobiologische Standardmethoden	74
4.6.1	Rubidium-Chlorid-vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	74
4.6.2	Kalzium-Chlorid-vermittelte Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	75
4.7	Biochemische Methoden	76
4.7.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	76
4.7.2	Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Westernblot)	77
4.7.3	Proteinbestimmung nach Bradford	78
4.7.4	Heterologe Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	79
4.7.5	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	79

4.7.6	(Co-) Immunopräzipitation mit Biotin-Zip1	81
4.7.7	Aktivitäts-basierte Markierung von PLCPs.....	82
4.7.8	Protease-Aktivitätstest	83
4.7.9	Prozessierungsassays.....	84
4.7.10	Nachweis der Aktivierung (Phosphorylierung) von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) in Mais	84
4.7.11	Messung von reaktiven Sauerstoffspezies in Maisblattscheiben.....	84
4.7.12	Quantifizierung des endogenen SA Levels in Maisblättern	85
4.7.13	Massenspektrometrische Analyse von apoplastischem Maisfluid	86
4.8	Pflanzenmethoden	87
4.8.1	Maisvarietäten	87
4.8.2	Kultivierung von <i>Zea mays</i>	87
4.8.3	Kultivierung von <i>Nicotiana benthamiana</i>	87
4.8.4	Salicylsäure-Infiltration und Peptidbehandlung von Mais	88
4.8.5	Isolation und Fraktionierung von apoplastischem Fluid aus Mais.....	88
4.8.6	Infiltration von <i>N. benthamiana</i> mit <i>A. tumefaciens</i>	88
4.8.7	Präparation von apoplastischem Fluid aus <i>N. benthamiana</i>	89
4.9	Mikroskopie	89
4.10	Bioinformatische Analysen.....	90
4.10.1	Allgemeine Bioinformatik.....	90
4.10.2	Bioinformatische Analysen für die in dieser Arbeit generierten RNAseq Daten.....	90
5	Literaturverzeichnis	94
6	Anhang	115
	Abgrenzung der Eigenleistung.....	122
	Danksagung.....	123
	Lebenslauf.....	127

1 Einleitung

1.1 Das pflanzliche Immunsystem

Pflanzen besitzen im Unterschied zu Säugetieren kein adaptives, auf Antikörpern basiertes Immunsystem und sind somit auf ihre angeborenen Abwehrmechanismen angewiesen. Als erste physikalische Barriere gegen Fressfeinde und andere eindringende Pathogene besitzen Pflanzen Stacheln, Blatthärchen, eine durch Lignin verstärkte Zellwand und eine ausschließlich von Epidermiszellen ausgebildete wachsartige Cuticula (Dangl *et al.*, 2001; Hückelhoven, 2007; Koeck *et al.*, 2011). Diese bietet nicht nur Schutz vor mikrobiellem Befall, sondern schützt die Pflanzenzelle auch vor Austrocknung und anderen biotischen und abiotischen Umweltfaktoren. Neben dem physikalischen Schutz bieten zudem antimikrobielle Sekundärmetabolite wie Saponine, Glucosinolate, cyanogene Glycoside oder ätherische Öle wie z.B. Limonen eine chemische Abwehr gegen Pathogene (Osbourn, 1996; Wallace, 2007).

Während das Immunsystem von Säugetieren vorwiegend auf mobilen Immunzellen basiert, muss jede einzelne Pflanzenzelle Pathogene erkennen und eine Immunreaktion auslösen können. Pflanzen besitzen daher nur ein angeborenes, mehrschichtig induziertes Immunsystem. Die erste Ebene beruht auf der Erkennung von evolutiv hoch konservierten, molekularen Strukturen, den sogenannten MAMPs oder PAMPs (engl. *microbe-/pathogen associated molecular patterns*) und DAMPs (engl. *damage-associated molecular patterns*) durch spezifische RLKs (engl. *receptor-like kinases*) und RLPs (engl. *receptor-like proteins*), die als PRRs (engl. *pattern recognition receptors*) fungieren (Boller *et al.*, 2009a; Couto *et al.*, 2016; Dodds *et al.*, 2010; Zipfel, 2014). Die Perzeption von MAMPs bzw. DAMPs und die darauffolgende Immunantwort wird als PTI bezeichnet (engl. *PAMP-triggered immunity*) (Jones *et al.*, 2006).

Die bekanntesten PTI Immunauslöser, die vor allem in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* erforscht wurden, sind flg22, welches ein Bestandteil von Flagellin des bakteriellen Flagellums ist, und elf18, das ein Teil des bakteriellen Elongationsfaktors EF-Tu ist (engl. *ELONGATION FACTOR THERMO UNSTABLE*). Beide Moleküle werden jeweils durch die LRR-RLKs (engl. *leucine-rich repeat receptor-like kinases*) FLS2 (engl. *FLAGELLIN SENSING 2*) und EFR (engl. *EF-TU*

RECEPTOR) erkennt (Gomez-Gomez *et al.*, 2000; Zipfel *et al.*, 2006). Lipopolysaccharidbestandteile (LPS) der Zellmembran von Bakterien werden in Pflanzen, ähnlich der Toll-*like* Rezeptor 4 (TLR4)-Erkennung bei Säugetieren, von dem spezifischen Rezeptor LORE (engl. LIPOOLIGOSACCHARIDE-SPECIFIC REDUCED ELICITATION) erkannt und lösen eine Immunantwort aus (Ranf, 2016; Ranf *et al.*, 2015). Saccharid-basierte Zellwandkomponenten von Pilzen und Chitin bei Oomyceten werden durch den Rezeptorkomplex von CERK1 (engl. CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1) und LYK5 (engl. LYSM-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE 5) erkannt. Bei diesen handelt es sich um Lysin-Motiv-enthaltene Rezeptor-ähnliche Kinasen, die antifungal Immunität induzieren (Gust *et al.*, 2012; Miya *et al.*, 2007; Willmann *et al.*, 2011). Andere Studien zeigten die Perzeption von Peptidoglykan ebenfalls durch CERK1, welche in diesem Fall einen Rezeptorkomplex mit LYM1 und LYM3 (engl. LYSM DOMAIN-CONTAINING GPI-ANCHORED PROTEIN 1/3) bilden, um eine antibakterielle Immunantwort auszulösen.

Weitere membrangebundene Rezeptoren sind für die Perzeption von DAMPs zuständig, welche endogene Signalmoleküle der Pflanze sind (Boller und Felix, 2009a; Boller *et al.*, 2009b; Chisholm *et al.*, 2006). DAMPs werden bei Pathogenbefall oder Verletzung durch Fraßfeinde freigesetzt. Sowohl Zellwandbestandteile als auch cytoplasmatische Proteine können als DAMPs fungieren und eine nicht-infektiöse Immunantwort hervorrufen. Der DAMP-Rezeptor WAK1 (engl. WALL-ASSOCIATED KINASE 1), der sich durch eine EGF (engl. EPIDERMAL GROWTH FACTOR-LIKE) Ektodomäne auszeichnet, erkennt Oligogalacturonat, den Hauptbestandteil von Pektin (Brutus *et al.*, 2010). Anders als WAK1 ist die Rezeptorklasse von PEPR1 und PEPR2 (engl. PLANT ELICITOR PEPTIDE RECEPTOR PROTEIN 1) für die Wahrnehmung der endogenen Peptide AtPep1-6 zuständig (Krol *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2006). Während eines pathogenen Befalls werden diese freigesetzt und dienen der Amplifikation der pflanzlichen Immunantwort (Huffaker *et al.*, 2011).

Der oben beschriebene Teil der PTI bezieht sich auf rasche, innerhalb weniger Minuten auftretende Abwehrmechanismen der Pflanze und beinhaltet u.a. den Einstrom von H⁺- und Ca²⁺ Ionen über die Plasmamembran. Intrazellulär fungiert vor allem Kalzium als *second messenger* und aktiviert sogenannte CDPKs (engl. CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASES) und Mitogen (Doehlemann *et al.*,

2008) aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) Kaskaden, die für die Regulation der angeborenen Immunität der Zelle verantwortlich sind (Cheval *et al.*, 2013; Couto und Zipfel, 2016; Lee *et al.*, 2015; Seybold *et al.*, 2014). Sie sind auch für die direkte Aktivierung von ROS (engl. *reactive oxygen species*)-produzierenden NADPH-Oxidasen zuständig (Seybold *et al.*, 2014). Die während der PTI freigesetzten Signale können amplifiziert werden und zu einer verstärkten Immunantwort führen. Diese Prozesse werden durch Phytohormone vollzogen (Couto und Zipfel, 2016; Pieterse *et al.*, 2012). Dabei handelt es sich vornehmlich um Salicylsäure (Abk. „SA“ engl. für *Salicylic acid*) und Jasmonsäure, sowie Ethylen (Abk. „JA/Et“ engl. für *Jasmonic acid/Ethylene*) (Conrath *et al.*, 2015). SA und JA induzieren die Produktion antimikrobieller Sekundärmetabolite, die Akkumulation von PR (engl. *pathogenesis-related*) -Proteinen, wie beispielsweise Chitinasen und Glukanasen und veranlassen die Synthese von Callose und Lignin zur Stärkung der Zellwand (Conrath *et al.*, 2015; Gómez-Gómez *et al.*, 1999; van Loon *et al.*, 2006).

Im Laufe der Evolution haben sich Pathogene auf ihren jeweiligen Wirt spezialisiert (Jones und Dangl, 2006). Die meisten pathogenen Mikroorganismen können die beschriebene erste Barriere der pflanzlichen Immunantwort umgehen, indem sie Effektorproteine in die Wirtspflanze injizieren. Diese werden dann als Avirulenzproteine (Avr) bezeichnet (Chisholm *et al.*, 2006; Dodds und Rathjen, 2010; Jones und Dangl, 2006; Takken *et al.*, 2006). Die Manipulation des Immunsystems führt zur Suppression von PTI und macht die Pflanze wieder suszeptibel für ihren Eindringling. Man spricht hierbei von ETS (engl. *Effector-triggered susceptibility*). Pflanzen haben im Gegenzug Resistenzproteine (R) entwickelt, die Avirulenzproteine oder deren Wirkung erkennen, diese teilweise neutralisieren und eine gesteigerte Immunantwort auslösen können. Die zweite Stufe der Immunität wird auch als ETI (engl. *Effector-triggered immunity*) bezeichnet (Jones und Dangl, 2006). Die dadurch ausgelöste Immunantwort fällt meist stärker als die der PTI aus. Es kommt zur Amplifikation der PTI-Reaktion, was in vielen Fällen in einer HR (engl. *Hypersensitive response*) und im lokalen Zelltod des infizierten Gewebes mündet. Fern der primären Infektionsstelle und der ersten und zweiten Stufe der Immunantwort kommt es zur sogenannten SAR (engl. *Systemic acquired resistance*). SAR schützt die Pflanze vor weiterem Pathogenbefall und ist gegen ein breites Spektrum von Schädlingen wirksam (Conrath *et al.*, 2015; de Wit, 2007).

Die größte Klasse der an ETI beteiligten R-Proteine ist die der NBS-LRRs (engl. NUCLEOTIDE-BINDING SITE LEUCIN-RICH REPEAT RECEPTOR) (Cui *et al.*, 2015; Dangl und Jones, 2001). Sie verfügen über eine Nukleotidbindestelle, eine Leucin-reiche Domäne, die ähnlich der von membrangebundenen RLKs ist und über variable N- und C-Termini. Die Einteilung von NBS-LRRs in zwei große Unterfamilien definiert sich über die N-terminale Domäne (Dangl und Jones, 2001). Ist diese durch die Präsenz einer Toll/interleukin-1-Rezeptordomäne gekennzeichnet, spricht man von TIR-NBS-LRRs (TNLs). Besitzt sie eine *coiled-coil*-Domäne, die im Gegensatz zu TNLs nicht nur auf Dikotyledonen beschränkt ist, sondern auch in Monokotyledonen vorkommt, spricht man von CC-NBS-LRR (CNLs) (Dangl und Jones, 2001; Gay *et al.*, 2007; Jacob *et al.*, 2013). Die grundlegenden Mechanismen der pflanzlichen Immunabwehr sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Die Perzeption von Pathogenen aller Art durch das Immunsystem basiert genetisch auf der von Flor postulierten Gen-für-Gen-Hypothese, nach der eine direkte Interaktion von Avr-Produkten mit einem korrespondierenden R-Gen besteht (Flor, 1971; Jia *et al.*, 2000). Jedoch konnte in vielen Beispielen gezeigt werden, dass die Wirkung eines Effektorproteins auch indirekt durch NBS-LRRs überwacht wird. Bei solchen durch das *guard* (Bewacher)-Modell beschriebenen Interaktionen wird die Interaktion von einem Effektor (Avr) und *guard*-Protein (R) durch Rezeptoren bemerkt und eine Immunantwort eingeleitet (Dangl und Jones, 2001). Effektor-Zielproteine unterliegen einem hohen Selektionsdruck. Aus diesem Grund kam es im Laufe der Evolution zu Genduplikationen. Die so entstandenen Kopien der Genprodukte erfüllen ihre eigentliche Funktion nicht mehr und imitieren das Zielprotein nur (Nishimura *et al.*, 2010; van der Hoorn *et al.*, 2008). Sie dienen als Köder für Effektoren, was in der *decoy* (Köder)-Hypothese formuliert wurde (Cesari *et al.*, 2014; van der Hoorn und Kamoun, 2008; Wu *et al.*, 2015). Ein prominentes Beispiel für ein *decoy*-Protein ist die Cysteinprotease RCR3 aus der Tomate, *Solanum lycopersicum* (Shabab *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2009). RCR3 ist genauso wie die Cysteinprotease PIP1 ein PR-Protein, das während der Infektion mit diversen Pathogenen oder in Reaktion auf SA-Applikation in den Tomatenapoplasten sekretiert wird (Rooney *et al.*, 2005; Shabab *et al.*, 2008). Der Effektor Avr2 aus dem pilzlichen Tomatenpathogen *Cladosporium fulvum* inhibiert beide Proteasen.

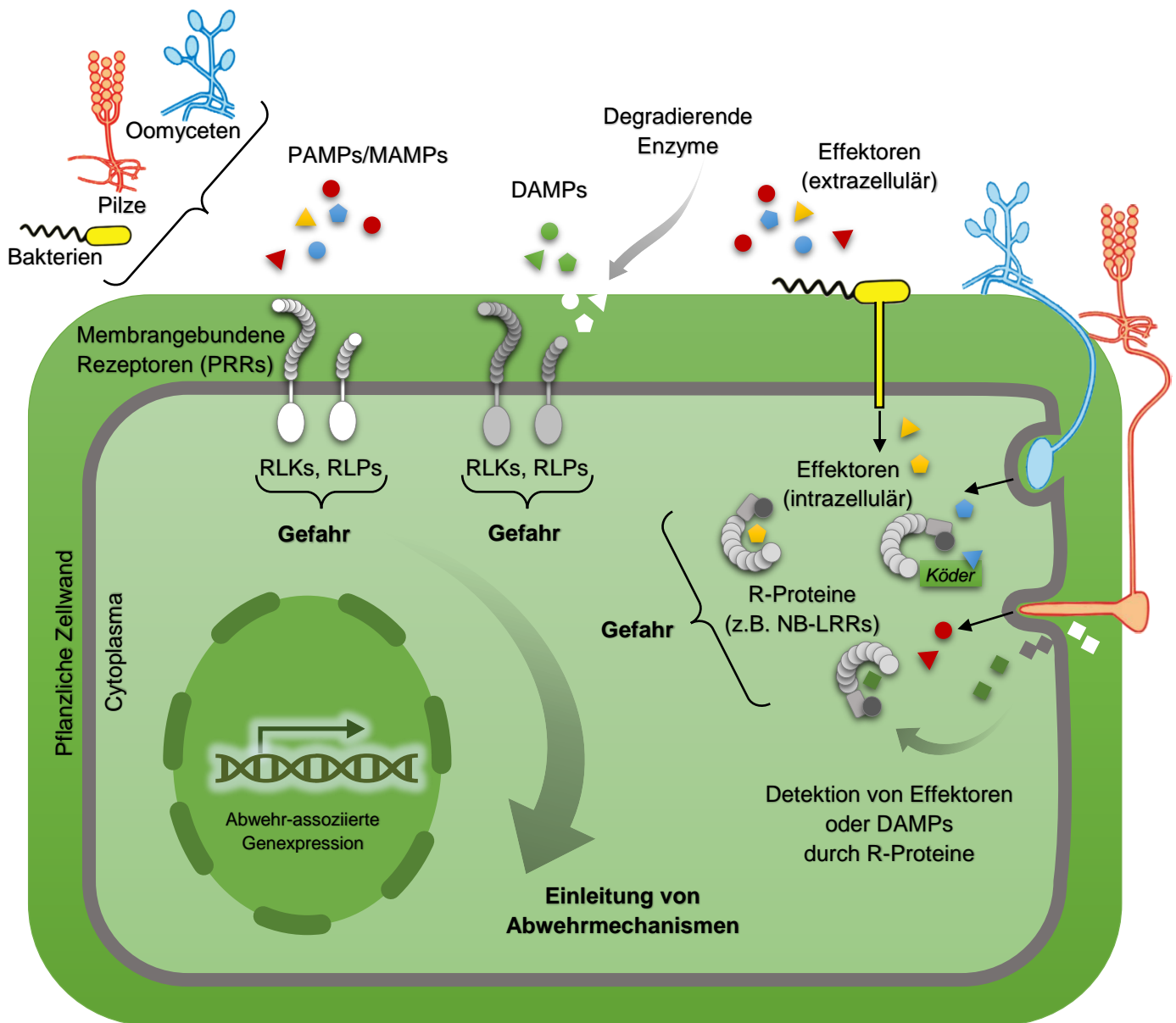


Abb. 1: Die grundlegenden Mechanismen der pflanzlichen Immunabwehr. Extrazelluläre PAMPs (*microbe-/pathogen associated molecular patterns*) und DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) werden von spezifischen PRRs (*pattern recognition receptors*) als Gefahrensignal erkannt (PTI= *PAMP-triggered immunity*). Im Zuge der Coevolution haben Pathogene Effektoren entwickelt, um dieser Erkennung zu entkommen (ETS= *effector-triggered susceptibility*). Pflanzen indes evolvieren angepasste Resistenz (R)-Proteine bzw. neue PRRs, um Effektoren zu detektieren und ETS zu unterbinden (ETI= *effector-triggered immunity*). RLK= *receptor-like kinase*, RLP= *receptor-like protein*, NB-LRR= *nucleotide-binding-leucine-rich repeat*. Modifiziert nach Boller und Felix, 2009.

Interessanterweise hat die Hemmung von RCR3 keinen Einfluss auf die Virulenz des Pathogens. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Avr2 mit RCR3 durch das Protein Cf-2 überwacht wird (Rooney *et al.*, 2005). RCR3 stellt demnach ein *decoy*-Protein dar, mithilfe dessen die Erkennung des Pilzes durch Cf-2 (*guard*) über Avr2-Interaktion erfolgen kann (Dixon *et al.*, 2000).

Vor allem die *guard/decoy*-Hypothese verdeutlicht, dass es zwischen Pathogen und Wirtspflanze ständig zu neuen Anpassungen und Modifikationen kommen muss. Das „molekulare Wettrüsten“ wird anschaulich im *Zig-Zag*-Modell nach Dangl und Jones (2006) zusammengefasst. Pathogene entwickeln demnach fortwährend neue Effektoren, um die durch ETI ausgelöste Immunantwort der Wirtspflanze zu supprimieren und ETS zu etablieren

1.2 Phytohormone im Netzwerk des pflanzlichen Immunsystems

Phytohormone sind pflanzeneigene, biochemisch wirkende organische Verbindungen, die als Botenstoff eine Vielzahl von Funktionen beim Wachstum und bei der Entwicklung von Pflanzen, aber auch bei deren Reproduktion und ihrer Immunantwort einnehmen. Zu den wichtigsten Phytohormonen gehören Abscisinsäure (ABA), Auxine, Brassinosteroide (BR), Cytokine, Ethylen (ET) und Gibberelline sowie die bereits erwähnten Signalmoleküle SA und JA (Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012). Im Laufe der letzten Jahre wurden nicht nur SA und JA, sondern auch Gibberellinen, ABA, Auxinen, Cytokinen und Brassinosteroiden wichtige Funktionen bei der Immunantwort zugewiesen (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Für BRs konnte gezeigt werden, dass diese additiv zu Auxinen für die Initiierung des Sprosswachstums in Form von Zellteilung und -streckung verantwortlich sind (Irving *et al.*, 2012). Ihnen konnte jedoch ebenfalls eine wichtige Funktion in der Immunantwort zugeordnet werden (Albrecht *et al.*, 2012; Lozano-Duran *et al.*, 2013; Lozano-Duran *et al.*, 2015). Sowohl flg22 als auch das Brassinosteroid Brassinolid (BL), das durch den Rezeptor BRI1 (engl. *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1*) erkannt wird, lösen distinkte, nicht überlappende Reaktionen aus. Behandelt man Wildtyppflanzen von *A. thaliana* mit flg22 und BL gleichzeitig, fällt die PTI-Reaktion der Pflanze im Vergleich zur alleinigen flg22-Behandlung geringer aus (Lozano-Duran *et al.*, 2013). Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen einen einseitig gerichteten, negativen

Crosstalk zwischen der Signalwirkung von PTI und BRs und somit eine molekulare Feinabstimmung (*trade-off*) zwischen Wachstum und Immunität. Der molekulare Hintergrund dieser Verbindung ist noch weitestgehend unerforscht. Es wurde lediglich gezeigt, dass die Inhibition der PTI durch BL unabhängig vom gemeinsamen Co-Rezeptor BAK1 (engl. *BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1*) und unabhängig von der direkten Phosphorylierung von FLS2 stattfindet (Albrecht *et al.*, 2012). Der *Crosstalk* findet demnach stromabwärts innerhalb der beiden Signalkaskaden statt (Lozano-Duran *et al.*, 2013; Lozano-Duran und Zipfel, 2015).

Doch zu welchem Zweck haben Pflanzen dieses feinabgestimmte und facettenreiche Hormonnetzwerk entwickelt? Die vielen regulatorischen Möglichkeiten durch Hormonesignale erlauben der Pflanze schnell und vor allem energieeffizient auf biotische und abiotische Umwelteinflüsse zu reagieren. Erst bei Befall werden die Energiereserven, die hauptsächlich für Entwicklung, Wachstum und Reproduktion bestimmt sind, für die induzierte Immunabwehr bereitgestellt. Die bei der Regulierung der Immunantwort wichtigsten Hormone sind JA und SA (Pieterse *et al.*, 2012).

Jasmonsäure und strukturell ähnliche Derivate sind Lipid-basierte Stoffe, deren rasche Synthese durch Pathogen- und Insektenbefall über den Oxylipinsynthese-Signalweg eingeleitet wird (Gfeller *et al.*, 2010). JA kann zu verschiedenen Isoformen metabolisiert werden, von denen die Konjugation mit der Aminosäure Isoleucin (Jasmonoyl-Isoleucin, JA-Ile) eines der biologisch aktivsten Enantiomere darstellt (Pieterse *et al.*, 2012).

Das F-Box Protein COI1 (engl. *CORONATE INSENSITIVE 1*) ist zusammen mit Proteinen der JAZ (eng. *JASMONATE ZIM*)-Familie der molekulare Schlüsselregulator der JA-Signalkaskade. Sie sind beide Teil des E3 Ubiquitin-Ligase SKP1-Cullin-F-Box-Komplexes SCF1^{COI1} und JA-Ile Rezeptoren (Sheard *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2009). JAZ Proteine agieren als Transkriptionsrepressoren, indem sie positive JA-Transkriptionsregulatoren binden. Unter JA-Ile wird die direkte Interaktion der JAZ-Proteine mit Transkriptionsaktivatoren aufgelöst. Die JA-abhängige COI1-Rekrutierung von JAZ zum SKP1-Komplex führt zum Ubiquitin-vermittelten Proteasomabbau und somit zu Aktivierung einer Vielzahl von JA Markergenen (Pieterse *et al.*, 2012). Zu diesen zählen unter anderem PDF1.2, HEL oder CHI-B, deren Genprodukte antimycotische Aktivität aufweisen (Lorenzo *et al.*, 2003; Penninckx *et al.*, 1996). JA Akkumulation in der Zelle erfolgt meist in Reaktion

auf nekrotrophe Pathogene (Glazebrook, 2005; Kunkel *et al.*, 2002). Diese kennzeichnen sich durch die Sekretion von Enzymen und Toxinen, die die attackierte Pflanzenzelle töten sollen, um auf diese Weise Nährstoffe verfügbar zu machen (Glazebrook, 2005; Hancock *et al.*, 1981). Im Gegensatz dazu sind biotrophe Pathogene auf lebendes Gewebe angewiesen, um ihren Lebenszyklus zu vollenden. Eine erfolgreiche Abwehr biotropher Pathogene bedingt die Aktivität des Phytohormons Salicylsäure (Glazebrook, 2005; Hancock und Huisman, 1981).

Salicylsäure gehört zu den phenolischen Phytohormonen und spielt eine der Hauptrollen bei der pflanzlichen Krankheitsresistenz. SA wird aus dem Vorläufermetabolit Chorismat über zwei unterschiedliche enzymatische Reaktionswege synthetisiert. An diesen sind zum einen PALs (engl. *PHENYLALANINE AMMONIA LYASES*) und zum anderen ICS (engl. *ISOCHORISMATE SYNTHASE*) beteiligt (Garcion *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2012; Wildermuth *et al.*, 2001). Die Synthese wird als Folge der Erkennung von PAMPs und Effektorproteinen während der PTI und ETI initiiert. Ein entscheidender Sensor dabei ist der durch Pathogenbefall ausgelöste intrazelluläre Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration (Du *et al.*, 2009). Die durch SA aktivierte Signalkaskade ist größtenteils durch das Regulatorprotein NPR1 (engl. *NON-EXPRESSOR OF PR GENES 1*) kontrolliert und für SAR und die meisten anderen SA-Signalprozesse verantwortlich (Cao *et al.*, 1997; Dong, 2004; Kinkema *et al.*, 2000). NPR1 liegt als Oligomer im Cytoplasma vor und wird durch intermolekulare, redoxsensitive Disulfidbrücken zusammengehalten (Mou *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2008). Durch SA-induzierte Redoxveränderungen in der Zelle kann monomerisiertes NPR1 in den Kern diffundieren und dort als Transkriptions-Coaktivator einer Vielzahl von *PR*-Genen mit antimikrobieller Wirkung fungieren (Dong, 2004; Moore *et al.*, 2011; van Loon *et al.*, 2006). Obwohl bisher nicht gezeigt werden konnte, dass SA direkt von NPR1 gebunden wird, wurden dennoch zwei paraloge Cullin3-Ubiquitin-E3-Ligase-Adaptorproteine, NPR3 und NPR4, identifiziert, die in SA-Konzentrationsabhängigkeit für die Degradation von NPR1 verantwortlich sind (Fu *et al.*, 2012). Eine geringe SA-Konzentration löst den NPR1-NPR4-Komplex auf und verhindert so eine NPR4-vermittelte Degradation.

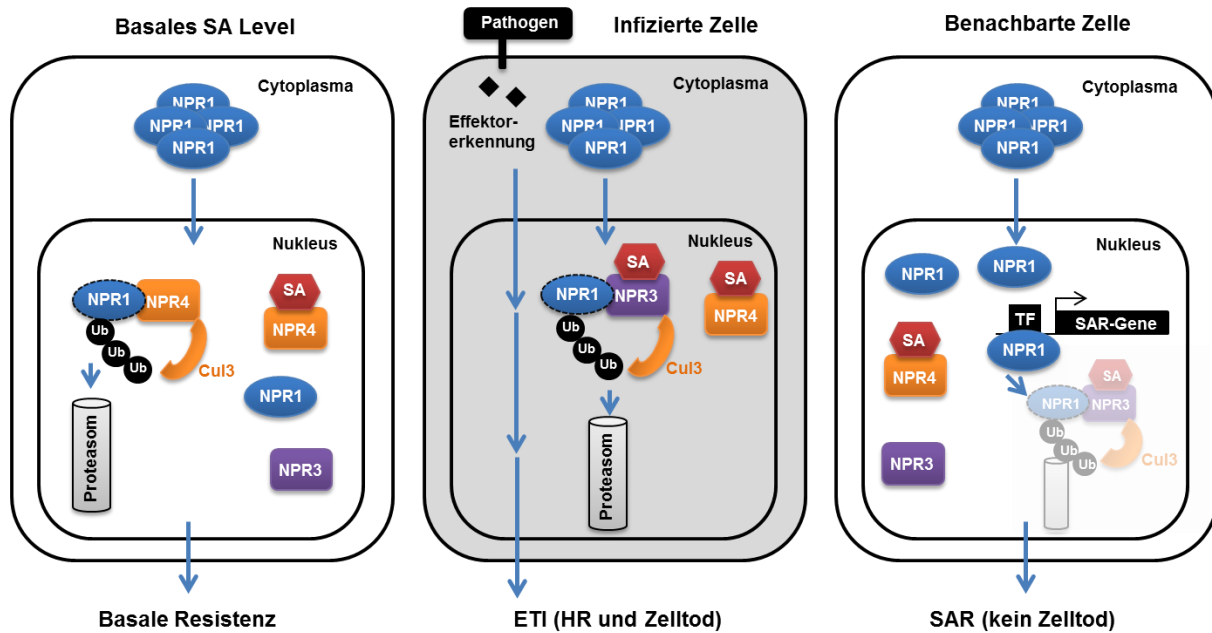


Abb. 2: Die SA-Rezeptoren NPR3 und NPR4 kontrollieren die NPR1-Homöostase. SA in basalen Konzentrationen wird durch NPR4 gebunden, um die SA-vermittelte NPR1-Degradation zu verringern. Dadurch kann eine geringe NPR1-Konzentration aufrechterhalten werden und es kommt zur basalen NPR1-vermittelten Resistenz. Unter Pathogenbefall steigt die lokale und systemische SA-Konzentration an. Hohe Konzentrationen in attackierten Zellen führen zum CUL3^{NPR3}-vermittelten NPR1-Abbau und es kommt zu ETI und programmiertem Zelltod. Geringere SA-Konzentrationen in benachbarten Zellen limitieren die NPR1-NPR3-Interaktion. Es kommt zur NPR1-Akkumulation und zur NPR1-vermittelten Hemmung des programmierten Zelltods und zur Etablierung von SAR. CUL3^{NPR3}-vermittelter NPR1-Abbau in diesen Zellen fördert die Abwehrgenexpression durch erhöhte Transkriptions-Reinitiierung. Ub= Ubiquitin, TF= Transkriptionsfaktor. Modifiziert nach Fu *et al.*, 2012.

Dadurch wird die Interaktion zwischen NPR1 und NPR3 und somit der Abbau von NPR1 bei hoher SA-Konzentration begünstigt (Fu *et al.*, 2012). Diese Erkenntnisse erklären vor allem die Rolle von NPR1 als Negativregulator der HR (Rate *et al.*, 2001; Vanacker *et al.*, 2001). Bei Pathogenbefall kommt es im Zuge von ETI zur SA-Synthese. Es entsteht ein SA-Gradient von der Infektionsstelle zu den benachbarten Zellen. Hohe SA-Konzentrationen verursachen den NPR3-vermittelten NPR1-Abbau. Dies führt zur HR und zum Zelltod, wohingegen die geringe Konzentration in den benachbarten Zellen NPR4-vermittelten Abbau verhindert und so SAR-Gene durch NPR1 aktiviert werden können. Somit wird der HR abhängige Zelltod lokal auf den Infektionsbereich beschränkt (Abb. 2, Fu *et al.* 2012).

Erste Hinweise auf einen **Crosstalk von SA und JA** zeigten Experimente mit Tomatepflanzen (Doherty *et al.*, 1988). SA und seine acetylierte Form zeigten sich als exzellente Suppressoren der JA-abhängigen Reaktion auf Verwundung (Doherty *et al.*, 1988; Pefia-Cortes *et al.*, 1993). Seit der Entdeckung der antagonistischen Wirkung von JA und SA, auch mit Bezug auf die Tatsache, dass Pflanzen in der

Natur oft mit gleichzeitigem Befall unterschiedlicher Pathogene zu kämpfen haben, konnte der SA/JA-Crosstalk schon in vielen weiteren Pflanzen nachgewiesen werden (Bostock, 2005; Spoel, 2003; van Wees *et al.*, 1999; Verhage *et al.*, 2011). Beispielsweise wird die JA-abhängige Immunantwort in *A. thaliana*, die von Kohlräupen induziert wird, durch nachfolgenden Angriff des SA-induzierenden biotrophen Oomyceten *Hyaloperonospora arabidopsidis* supprimiert (Koornneef *et al.*, 2008).

Das Zusammenspiel und die Kombination von JA und SA untereinander und mit anderen Phytohormon-abhängigen Signalkaskaden eröffnet Pflanzen eine große regulatorische Kapazität, um ihre Immunantwort auf einzelne Pathogene und sich ändernde Umweltfaktoren abzustimmen.

1.3 Pflanzliche Signalpeptide

Allen Prozessen in komplexen Signalnetzwerken liegt die Perzeption von Liganden zugrunde. Liganden können Gase, kleine Moleküle wie Phytohormone, aber auch kleine Proteine bzw. Peptide sein. Sie werden von spezifischen Rezeptoren erkannt, die das Signal weiterleiten und entsprechende physiologische Prozesse stimulieren (Boller und Felix, 2009a; Boller und He, 2009b; Couto und Zipfel, 2016). Peptide sind als Signalmoleküle an einer breiten Vielfalt von biologischen Funktionen beteiligt, die von Zellentwicklung und -differenzierung bis hin zur Immunantwort reichen (De Coninck *et al.*, 2016). Seit der Entdeckung von biologisch aktiven Peptiden in Pflanzen ist die Zahl solcher, die als Signalmoleküle klassifiziert werden konnten, enorm gestiegen. Über 15 verschiedene Peptidfamilien, die Wachstum und Entwicklung beeinflussen, sind mittlerweile in *A. thaliana* bekannt (Irving und Gehring, 2012).

Ein wichtiger Negativregulator für den Ausgleich zwischen Stammzellerhaltung im Sprossapikalmeristem (SAM) und der Differenzierung zu Organen in *A. thaliana* ist das Peptid **CLV3** (CLAVATA 3) aus der gut untersuchten CLE-Peptid-Familie (Clark *et al.*, 1995). *Clv3* Mutanten bilden einen Überschuss an Stammzellen im SAM und bekommen so ein verdicktes Meristem, welches phänotypisch einer Keule (lat. *clava*) ähnelt (Clark *et al.*, 1995).

Eine Übersicht über repräsentative Peptidfamilien und deren Funktion in *A. thaliana* ist in Tabelle 1 gezeigt. Endogene Pflanzenpeptide nehmen jedoch nicht nur

bei Entwicklungsprozessen eine wichtige Aufgabe wahr, sondern sind auch maßgeblich bei Erkennung von Gefahr und der pflanzlichen Immunantwort beteiligt (Irving und Gehring, 2012; Marmioli *et al.*, 2014).

Systemin ist das erste Peptid-Signalmolekül, das in Pflanzen entdeckt wurde (McGurl *et al.*, 1992; Pearce *et al.*, 1991). Das aus 18 Aminosäuren bestehende Peptid induziert die Synthese von Proteinaseinhibitoren in verwundeten Tomatenblättern (Pearce *et al.*, 1991). Seinen Namen bekam es durch die Mitwirkung an der systemischen Antwort, in der Proteinaseinhibitoren auch oberhalb des verwundeten Blattes produziert werden (Farmer *et al.*, 1992). Diese systemische Wirkung geht mit der durch Verwundung induzierten Synthese von JA einher, womit Systemin an der JA-abhängigen Immunantwort der Tomate beteiligt ist (Farmer *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 2007).

Ähnlich wie Systemin konnte das 23 Aminosäuren lange Peptid **AtPep1** aus verwundeten *A. thaliana* Blättern isoliert und charakterisiert werden (Huffaker *et al.*, 2006). AtPep1 gehört zu einer aus sieben Peptiden bestehenden Familie. Die Transkription des Vorläuferpeptids PROPEP1 wird durch MeJA induziert (Huffaker *et al.*, 2007). PROPEP2/3 werden im Gegensatz dazu durch MeSA induziert (Huffaker und Ryan, 2007). Alle AtPeps, AtPep4 ausgenommen, leiten die Expression von Abwehrgenen ein. ROS-Produktion, Depolarisation der Membran durch Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen und die Synthese des Stresshormons Ethylen sind weitere Prozesse, die durch Peptidbehandlung eingeleitet werden (Krol *et al.*, 2010). Die durch AtPep1 hervorgerufene Immunreaktion konnte als biologisch relevant beschrieben werden, da PROPEP1 Überexpressionslinien eine erhöhte Resistenz gegenüber *Pythium irregulare* aufweisen (Huffaker *et al.*, 2006). Ebenso entwickeln mit AtPep1 vorbehandelte Wildtyppflanzen eine höhere Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* Pathovar *tomato* DC3000 (Yamaguchi und Huffaker, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2006). Yamaguchi und Mitarbeiter konnten durch Photoaffinitätsmarkierung den Rezeptor identifizieren, der zur Klasse XI der LRR-RLK Rezeptorfamilie gehört (Yamaguchi *et al.*, 2006). PEPR1 perzeptiert AtPep1, 2, 3, 5 und 6, wobei *pepr1* Deletionsmutanten immer noch sensitiv auf AtPep-Applikation reagieren. Die Schlussfolgerung daraus, dass mindestens ein weiterer Rezeptor an der Erkennung der AtPeps verantwortlich sein muss, konnte durch die Identifizierung einer zweiten membrangebundenen Rezeptorkinase PEPR2 bestätigt werden (Krol *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2010).

Signalpeptide erlangen ihre Aktivität erst durch proteolytische Prozessierung und/oder verschiedene posttranslationale Modifikationen. Die meisten pflanzlichen Signalpeptide sind sekretiert. Es ist daher naheliegend, dass die Prozessierungsmaschinerie im Sekretionsweg zu finden ist (Irving und Gehring, 2012). Mittlerweile konnte für einige Beispiele gezeigt werden, dass die proteolytische Prozessierung die biologisch aktiven Peptide freisetzt (De Coninck und De Smet, 2016; Pearce *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2008). Das bereits genannte AtPep1 wird nicht posttranslational modifiziert. Da es sich jedoch vom C-Terminus seines stark geladenen Propeptides herleitet, muss eine proteolytische Spaltung vorliegen (Huffaker *et al.*, 2006). Es wird daher spekuliert, dass die apoplastisch lokalisierte Aspartatprotease CDR1 (engl. CONSTITUTIVE DISEASE RESISTANCE 1) (Xia *et al.*, 2004), die bislang unbekannte mobile Peptidsignale für eine induzierte systemische Abwehrgenexpression generiert, eine wichtige Rolle bei der Freisetzung einiger AtPeps spielen könnte (Vlot *et al.*, 2009).

Für **RALF23**, ein Mitglied der RALF (engl. rapid alkalinization factor)-Familie, konnte in einem genetischen Screen die Subtilisin-ähnliche Protease S1P, die im Golgi lokalisiert (Liu *et al.*, 2007), als möglicher Prozessierungskandidat identifiziert werden (Srivastava *et al.*, 2008). Epitop-markierte RALF23 Präpropeptide werden in Wildtyppflanzen effizient prozessiert, wohingegen in *s1p* Mutanten keine Reifung von RALF23 nachweisbar ist (Srivastava *et al.*, 2009). RALF23 Prozessierung tritt rasch nach der PTI Antwort auf und konnte als dessen Negativregulator durch Bindung an seinen Rezeptor FER (FERONIA) charakterisiert werden. FER selbst ist Positivregulator der PTI und dient als Gerüstprotein der Immunrezeptorkomplexe FLS2-BAK1 und EFR-BAK1 (Stegmann *et al.*, 2017).

Tab. 1: Zusammenfassung von pflanzlichen Peptidsignalmolekülen in *A. thaliana*. Modifiziert nach H. R. Irving und C. Gehring „*Plant Signaling Peptides*“ (2012).

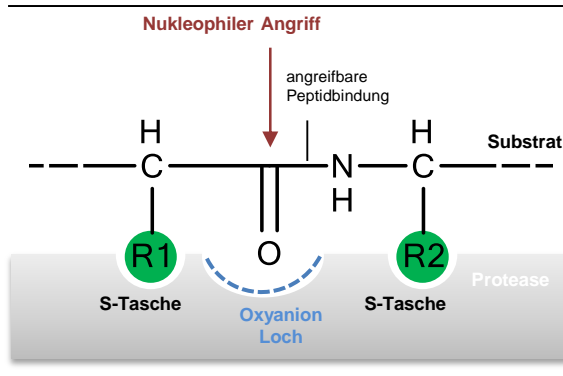
Propeptid	Propeptid-masse (kDa)	Prozessiertes Peptid, AS	Funktion	Rezeptor	Referenzen
CEP	8.5–11.5	CEP1, 14	Inhibiert Wurzelwachstum	Unbekannt	Ohyama et al. (2008)
CLE (und CLV3)	7.8–14.5	CLE oder CLV3, 12–14	Stimuliert Organogenese und inhibiert meristematisches Wachstum; stimuliert vaskuläre Entwicklung	CLV1, BAM1, CLV2, RPK2	Clark et al. (1995, 1997), Cock und McCormack (2001), Fiers et al. (2006), Kondo et al. (2006), DeYoung Clark (2008), Kinoshita et al. (2010)
DVL/RTFL	4.6–16.2	Nicht prozessiert	Zellproliferation, Blattentwicklung	Unbekannt	Narita et al. (2004), Wen et al. (2004), Ikeuchi et al. (2011)
EPF	11.5–14.3	Unbekannt	Fördert Epidermiszellteilung, die zur Schließzellbildung führt (Stomata)	TMM, ER, ERL1, ERL2	Hara et al. (2007, 2009), Hunt und Gray (2009)
IDA und IDL	8.4–13	EPIP	Inhibiert Blütenabszission	HAS, HSL	Butenko et al. (2003) Stenvik et al. (2006)
PROPEP	9.3–12.3	Pep1, 23	Amplifiziert Immunreaktionen	PEPR1, PEP2	Huffaker et al. (2006), Yamaguchi et al. (2006), Pearce et al. (2008), Qi et al. (2010)
PNP	13–14	Unbekannt	Zellwachstum, Wasser/Ionen Bewegung, Stomataöffnung, inhibiert ABA-induzierte Stomataschließung	Unbekannt	Gehring et al. (1996), Maryani et al. (2001), Ludidi et al. (2002), Rafudeen et al. (2003), Wang et al. (2007), Gottig et al. (2008), Ruzvidzo et al. (2011), Wang et al. (2011)
PSK	8.7–9.7	PSK-α, 5	Fördert Zellwachstum und -persistenz, Wurzelverlängerung,	PSKR1	Matsubayashi und Sakagami (1996), Lorbiecke Sauter (2002), Matsubayashi et al. (2002, 2006), Kutschmar et al. (2009)
PSY	7.9	PSY1, 18	Zellexpansion und -teilung, induziert durch Verwundung	PSYR1	Amano et al. (2007)
RALF und RALFL	7–14	RALF, 25–30	Gefahrssignal, inhibiert Wurzelwachstum	FER	Pearce et al. (2001), Silverstein et al. (2007), and Wu et al. (2007)
RGF1	13	13	Wurzelstammzellerhaltung in innerer Columellazellschicht	Unbekannt	Stegmann et al. (2017) Matsuzaki et al. (2010)
SCRL	9.2–11.5	Nicht prozessiert	Verhindert Selbstbefruchtung (aber nicht in <i>A. thaliana</i>)	SRK	Schopfer et al. (1999) Vanoosthuysen et al. (2001)
TPD	19.5	TPD1	Antherenentwicklung, fördert Tapetumformation	EMS1	Yang et al. (2003) Jia et al. (2008)

1.4 Die Bedeutung von Cysteinproteasen bei der Pflanzenabwehr

Pflanzliche Genome weisen hunderte unterschiedliche Proteasen auf, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind. Zu diesen zählen unter anderem die Meiose, Stomataentwicklung, Embryogenese oder die Lagerung und Freisetzung von Speicherproteinen im Samen (Okamoto *et al.*, 1995). Entscheidende Schlüsselrollen spielen Proteasen ebenfalls bei der Pathogenerkennung und der daraus folgenden Induktion der lokalen und systemischen Abwehrreaktion (van der Hoorn, 2008).

Obwohl die funktionelle Diversität enorm hoch und die räumliche und zeitliche Aktivität von Proteasen streng reguliert ist, katalysieren alle dieselbe Reaktion: Die Hydrolyse von Peptidbindungen. Über Aminosäurereste interagiert das Substrat mit den spezifischen Bindetaschen der Protease, während die Carbonylgruppe der angreifbaren Peptidbindung im sogenannten Oxyanion-Loch polarisiert und somit für einen nukleophilen Angriff zugänglich gemacht wird. Je nach Art des angreifenden Nukleophils unterscheidet man zwischen Cystein-, Serin-, Metallo-, Glutamat- und Aspartatproteasen (Sims *et al.*, 2004; van der Hoorn, 2008) (Tab. 2). Auf Basis von evolutionären und strukturellen Kriterien werden Proteasen mitsamt ihren Substraten und Inhibitoren auf der MEROPS Proteasen Datenbank (merops.sanger.ac.uk) des Sanger Instituts in Familien und Clans unterteilt (Rawlings *et al.*, 2008a).

Katalytische Klasse	Nukleophil	Oxyanion Stabilisator
Cysteinprotease	Cys-His	-NH-(2x)
Serinprotease	Ser-His	-NH-(2x)
Aspartatprotease	H ₂ O-Asp	H ⁺ -Asp
Glutamatprotease	H ₂ O-Glu	H ⁺ -Glu
Metalloprotease	H ₂ O-Me ²⁺	Me ²⁺



Tab. 2: Übersicht über die fünf verschiedenen Proteasehauptklassen mit einer schematischen Darstellung des Reaktionsmechanismus. Die Hauptunterschiede der Proteaseklassen beruhen auf unterschiedlichen Nukleophilen und Oxyanion-Stabilisatoren. Cystein- und Serinproteasen nutzen jeweils einen Cystein- bzw. Serinrest als Nukleophil, der durch Histidin im aktiven Zentrum aktiviert wird. Metallo-, Glutamat- und Aspartatproteasen hingegen polarisieren ein Wassermolekül, welches als Nukleophil während der Katalyse dient. Das Oxyanion-Loch wird durch Aminosäurereste des Protease-Rückgrats stabilisiert. Das Substratprotein (schwarz) bindet über Aminosäurereste (R) durch Interaktion mit Substratbindetaschen (S) in Substratbindedomäne (grau) des Enzyms. Im Oxyanion-Loch (blau) wird der Carbonyl-Sauerstoff der benachbarten Peptidbindung polarisiert, wodurch die Peptidbindung energetisch stabilisiert und der Carbonyl-Kohlenstoff für einen nukleophilen Angriff zugänglich gemacht wird. (modifiziert nach van der Hoorn, 2008)

Cysteinproteasen sind durch eine katalytische Triade bestehend aus Cystein, Histidin und Aspartat gekennzeichnet (Shindo *et al.*, 2008). Für die enzymatische Reaktion wird das Proton des Cysteins basenkatalytisch auf den Stickstoff des im aktiven Zentrum vorliegenden Imidazolrings des Histidins übertragen. Die negativ geladene Seitenkette eines Aspartatrestes stabilisiert die nun positiv geladene Seitenkette des Histidins. Darauf folgt der nukleophile Angriff des Thiolats am C1-Atom der Peptidbindung. Der dabei entstehende tetraedische Übergangszustand wird infolge einer Protonierung des Stickstoffs der Peptidbindung durch das Histidin gelöst, was zur Abspaltung des Stickstoffs führt. Zwischen Enzym und Substrat liegt folglich eine Thioesterbindung vor. Dieses Intermediat wird als Acylenzym-Komplex bezeichnet, welches durch einen nukleophilen Angriff des Wassers am partiell positiv geladenen C1-Atom über einen weiteren tetraedischen Übergangszustand gelöst wird. Dabei wird das Peptid mit neuer Carboxygruppe abgespalten und die Cysteinseitenkette wieder zum Thiol protoniert. Infolge der Spaltungsreaktion entstehen zwei Peptide mit jeweils neuem Amino- und Carboxyterminus (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/MACiE/>) (Tab. 2).

Seit der Entdeckung von **Papain** (G.C. Roy, 1973) rücken Cysteinproteasen immer mehr in den Fokus wichtige Regulatoren bei Entwicklungsprozessen, wie auch beim programmierten Zelltod und der Immunantwort von Pflanzen zu sein. Papain kommt in hoher Konzentration im Latex von Papayablättern (*Carica papaya*) vor (Balls *et al.*, 1939; Konno *et al.*, 2004). Hemmt man die Aktivität der Protease durch Bestreichen der Blätter mit dem Epoxid E-64, einem spezifischen Cysteinproteaseinhibitor, und verabreicht diese Schmetterlingsraupen zum Fraß, kommt es bei den Tieren zu einer signifikant schnelleren Gewichtszunahme der Larven als bei unbehandelten Blättern (Farrell *et al.*, 1991; J.B. *et al.*, 1969; Sethi *et al.*, 2009). Ein ähnliches Phänomen wie bei Papain zeigt sich bei der Überexpression der aus Mais stammenden Cysteinprotease **MIR1** (engl. *Maize imbred resistance 1*). Insektenlarven weisen ein gehemmtes Wachstum auf, wenn sie mit *mir1* überexprimierenden Maiskalli gefüttert werden (Pechan *et al.*, 2002; Pechan *et al.*, 2000). Beide Beobachtungen verdeutlichten die immense Wichtigkeit von Cysteinproteasen für die pflanzliche Abwehrreaktion. Papain gibt schließlich als prominentestes Beispiel auf Basis struktureller Ähnlichkeiten einem ganzen Clan (CA) von Cysteinproteasen den Namen PLCPs (engl. *papain-like cysteine proteases*).

Aufgrund des hohen Einflusses von PLCPs auf die Immunantwort haben Pathogene im Laufe der Evolution Effektoren entwickelt, mithilfe dessen sie diese spezifisch adressieren und so die Abwehrreaktion manipulieren können (Misas-Villamil *et al.*, 2016; van der Hoorn, 2008; van der Hoorn *et al.*, 2004). Neben dem bereits erwähnten Beispiel von PIP1/RCR3 und AVR2, ist die Cysteinprotease **C14** aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) Ziel zweier Effektoren (Kaschani *et al.*, 2010). Die beiden Cystatin-ähnlichen Proteine EPIC1 und EPIC2B werden durch *Phytophthora infestans* in den Apoplasten sekretiert und inhibieren dort die Aktivität von C14 (Kaschani *et al.*, 2010). Die hohe Bedeutung der Protease in der Reaktion auf Pathogenbefall wird weiterhin dadurch deutlich, dass *N. benthamiana* Pflanzen, in denen *C14* gesilenced wurde, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *P. infestans* aufweisen (Kaschani *et al.*, 2010).

Cathepsin B (CatB), dessen Namensgebung auf den gut erforschten, tierischen Cathepsinen beruht (Zavasnik-Bergant *et al.*, 2006), wird bei resistenten Kartoffelpflanzen durch eine *P. infestans*-Infektion transkriptionell hochreguliert (Avrova *et al.*, 2004). Während der HR in *N. benthamiana* kann sowohl die transkriptionelle Induktion als auch die Aktivierung von CatB festgestellt werden. Wird *CatB* stillgelegt, ist die Suppression der HR die Folge. Dies zeigt, dass CatB an der Pflanzenabwehr beteiligt ist (Gilroy *et al.*, 2007). Der Sekretionsprozess der Protease in den Apoplasten ist maßgeblich an der Reifung und der Aktivierung der Protease beteiligt (Gilroy *et al.*, 2007).

Die aufgeführten Beispiele geben Einblick in die vielfältigen Funktionen von Cysteinproteasen bei der pflanzlichen Immunantwort. Sie reichen vom direkten Angriff eines Pathogens bis hin zur feinen Regulation intrazellulärer Signalkaskaden, die letztendlich in HR münden können (van der Hoorn und Jones, 2004).

1.5 *Zea mays* – Kulturpflanze und Modellorganismus

Der Ursprungsgedanke Mais (*Zea mays*) als Modellorganismus zu nutzen, reicht bis ins 19. Jahrhundert zurück, als Gregor Mendel 1869 seine berühmten Kreuzungsversuche mit Erbsen (*Pisum sativum*) mit Mais bestätigte (Coe, 2001; Rhoades, 1984). Als frühe Pioniere der Maisforschung ergänzten die Botaniker Carl Correns und Hugo de Vries Mendels Entdeckungen mit Studien zur Xenie und waren dadurch ausschlaggebend an der Wiederentdeckung der Mendelgenetik beteiligt.

Allerdings gelten die beiden Genetiker R. A. Emerson und sein Doktorvater E. M. East in Forscherkreisen als Gründerväter der modernen Maisgenetik. Emerson selbst war später anerkannter Mentor der ersten Generation einflussreicher Maisgenetiker, zu denen auch Marcus Rhoades und die beiden Nobelpreisträger George Beadle und Barbara McClintock gehören.

Mais bleibt auch über die Jahre hinweg bis in die gegenwärtige Forschung ein wichtiger Modellorganismus. Mitgrund dafür ist wohl auch, dass der weltweite Jahresumsatz von mehreren Milliarden Dollar Mais zu einer der bedeutendsten Nutzpflanzen macht. Auf mehr als 180 Millionen Hektar wurden im Jahr 2016 weltweit 1,3 Milliarden Tonnen Mais angebaut (<http://foostat.fao.org>). Die von seiner Urform Teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) abstammende einhäusige C₄-Pflanze gehört zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*). Experimentelle Barrieren bei verschiedenen Süßgräserarten können durch die hohe Kolinearität der Genorientierung und -anordnung zwischen Mais, Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*), Reis (*Oryza sativa*), Weizen (*Triticum aestivum*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) umgangen werden. Diese Syntenie vereinfacht komparative Studien und bietet ein starkes Werkzeug zur Erforschung der Genomevolution von Mais und anderer Getreidearten (Devos, 2005; Ma *et al.*, 2004).

Ebenso wie in der Cytologie und Genetik hat sich Mais als Modellorganismus in der Erforschung des pflanzlichen Immunsystems etabliert. Die bereits beschriebene Peptidfamilie der AtPeps ist ebenfalls in Mais konserviert und trägt entsprechend den Namen ZmPep-Familie (Huffaker *et al.*, 2011). ZmPep1 aktiviert die *de novo* Synthese von JA und Et und induziert die Expression einiger Abwehrgene. Vorbehandelte Maispflanzen zeigen eine höhere Resistenz gegenüber zwei nekrotrophen Pathogenen, *Cochliobolus heterostrophus* and *Colletotrichum graminicola* (Huffaker *et al.*, 2011). Diese Erkenntnisse zeigen, dass die konservierte Funktion von Peptiden der Pep-Familie zukünftig Möglichkeiten zur Verbesserung der Resistenz in Getreidearten bietet (Huffaker *et al.*, 2013).

1.6 Die Rolle von PLCPs in der Immunantwort von Mais

Darüber hinaus konnte in Mais nebst der ZmPep/JA-Et Signalnetzwerke ein wichtiger Teil der antagonistischen, SA-abhängigen Immunantwort entschlüsselt werden, bei der PLCPs eine entscheidene Rolle spielen (van der Linde *et al.*,

2012a). Für die Aufklärung wurde der Modellorganismus *Ustilago maydis* verwendet. *U. maydis* ist ein phytopathogener Heterobasidiomycet und verursacht die weltweit auftretende Krankheit des Maisbeulenbrandes (Christensen, 1963). Die typischen Symptome einer Infektion von Chlorosen und gallenartige Strukturen (Tumore) an allen oberirdischen Maisorganen können als exzellenter Virulenzindikator zur Untersuchung der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen verwendet werden. Hinzu kommen die einfache Kultivierbarkeit und die gute genetische Zugänglichkeit des Pilzes. Dies ermöglicht sowohl zellbiologische und virulenzbezogene Studien am Pilz, als auch Untersuchungen an der alleinigen Wirtspflanze Mais (Matei *et al.*, 2016; Okmen *et al.*, 2014; Perez-Martin *et al.*, 2016; Redkar *et al.*, 2016a, b).

Die Deletion des Effektorgens *pit2* (*Protein important for tumors 2*) von *U. maydis* führt zur vollständigen Avirulenz des Pathogens (Doehlemann *et al.*, 2011). Parallel dazu konnten fünf PLCPs im Apoplasten von Mais nachgewiesen werden, die durch SA aktiviert werden und deren Aktivität hinreichend ist, um SA-assoziierte Genexpression zu induzieren (Abb. 3, van der Linde *et al.*, 2012). Pit2 konnte als PLCPs-Inhibitor von vier der fünf gefundenen Proteasen charakterisiert werden. Pit2 hemmt CP1A und B, CP2, XCP2, nicht aber CatB und stellt somit einen wichtigen Faktor bei der Unterdrückung der Maisspezifischen SA-abhängigen Immunantwort dar (Mueller *et al.*, 2013).

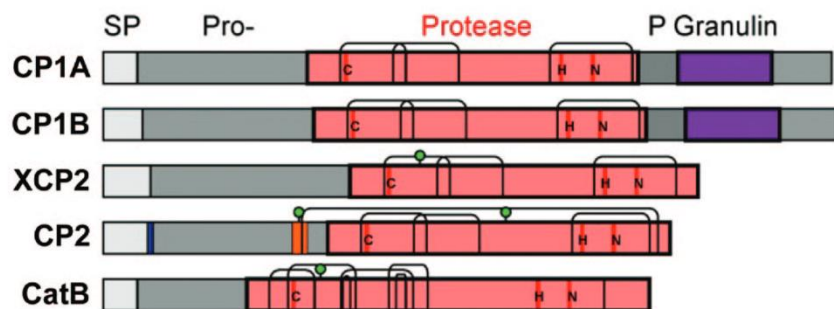


Abb.3: SA-induzierte, apoplastische Cysteinproteasen in Mais. PLCPs wurden in apoplastischem Fluid SA-behandelter Pflanzen mittels MS identifiziert. Alle Proteasen enthalten ein Signalpeptid (hellgrau), eine Prodomäne (dunkelgrau), eine C1 Peptidase-Domäne (rot). CP1A und CP1B besitzen zusätzlich eine C-terminale Granulindomäne (violett). Modifiziert nach van der Linde *et al.*, 2012b.

Sowohl während der kompatiblen, biotrophen Interaktion mit *U. maydis* wie auch nach JA-Behandlung kommt es in Maisblättern zur transkriptionellen Induktion von CC9 (engl. *CORN CYSTATIN 9*) (van der Linde *et al.*, 2012a). Das CC9-Gen codiert für ein apoplastisches Protein. Es konnte gezeigt werden, dass CC9 die SA-aktivierten PLCPs von Mais inhibiert (van der Linde *et al.*, 2012a; van der Linde *et*

al., 2012b). Legt man das Gen durch Virus-induziertes Gen-silencing (VIGS) still, kommt es während einer *U. maydis* Wildtyp-Infektion zu SA-assoziierten Immunreaktionen, die phänotypisch im Zelltod infizierter Blattbereiche resultieren. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Mais-spezifische SA-abhängige Immunantwort von der Aktivität dieser PLCPs anhängt und die Inhibition dieser durch CC9 und den Effektor Pit2 einen zentralen Mechanismus dargestellt, um SA-abhängige Abwehrreaktionen der Pflanze zu unterbinden (Mueller *et al.*, 2013; van der Linde *et al.*, 2012a).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die beschriebenen Versuche zeigen eine zentrale Rolle der SA-aktivierten PLCPs in der Immunantwort von Mais. Das Ziel dieser Arbeit war es aufzuklären, welche Signale die PLCP-vermittelte Immunantwort auslösen. Da es sich dabei aller Wahrscheinlichkeit nach um proteinogene Signale handelt, sollte dazu das Proteom des apoplastischen Fluids SA-behandelter Maispflanzen mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Das/Die so identifizierte(n) Peptidsignale sollte(n) hinsichtlich seiner/ihrer Wirkung auf *PR*-Genexpression und anderer Immunabwehrreaktionen analysiert werden. Um aufzuklären, ob es sich um ein Peptidsignal handelt, das aufgrund proteolytischer Spaltung durch die identifizierten PLCPs freigesetzt wird, war ein weiteres Ziel die biochemische Charakterisierung des Propeptids. Nach heterologer Expression und Aufreinigung sollten potenzielle Protease-Erkennungssequenzen mutiert und in *in vitro* Prozessierungsassays hinsichtlich einer Proteasespaltung getestet werden. Daraus würde sich die Frage ergeben, ob das *in vitro* freigesetzte Signal auch *in vivo* naiver Pflanzen Aktivität zeigt. Weitere Ziele stellten (a) die Analyse der transkriptionellen Reaktion auf (das) identifizierte Peptid(e) mittels RNA-Sequenzierung und (b) die biologische Relevanz der so induzierten Immunantwort hinsichtlich einer Pathogeninfektion dar. Ferner sollten durch Co-Immunopräzipitationsexperimente mögliche Peptid-Rezeptoren identifiziert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Induktion SA-assoziiierter *PR*-Genexpression durch Peptide im apoplastischen Fluid

In Vorarbeiten von van der Linde (2012a) konnte gezeigt werden, dass die SA-Behandlung von Maisblättern zur Aktivierung fünf apoplastischer PLCPs führt, die wiederum ihrerseits die Expression SA-assoziiierter *PR*-Gene induzieren. Um herauszufinden, ob diese Aktivität immunstimulierende Peptidsignale freisetzt, wurde apoplastisches Fluid (AF) Mock- und SA-behandelter Pflanzen isoliert. Anschließend wurde mittels Zentrifugation durch einen Amicon®-Filter die Protein- von der Peptidfraktion (<10 kDa) getrennt. Durch qRT-PCR (engl. *quantitative real-time PCR*) Analyse konnte 24h nach Behandlung naiver Pflanzen mit der Peptidfraktion eine erhöhte Expression SA-assoziiierter *PR*-Gene nachgewiesen werden. Die SA-Markergene *PR3*, *PR4* und *PR5* wurden signifikant durch Peptidfraktionen SA-behandelter Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle induziert (Abb. 4). Das JA-Markergen *CC9*, welches als Kontrolle bei den Experimenten diente, zeigte keine differenzielle Expression (Abb. 4). Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass die Aktivität apoplastischer PLCPs für die Freisetzung von Peptidsignalen, die eine SA-abhängige Immunantwort auslösen, verantwortlich ist.

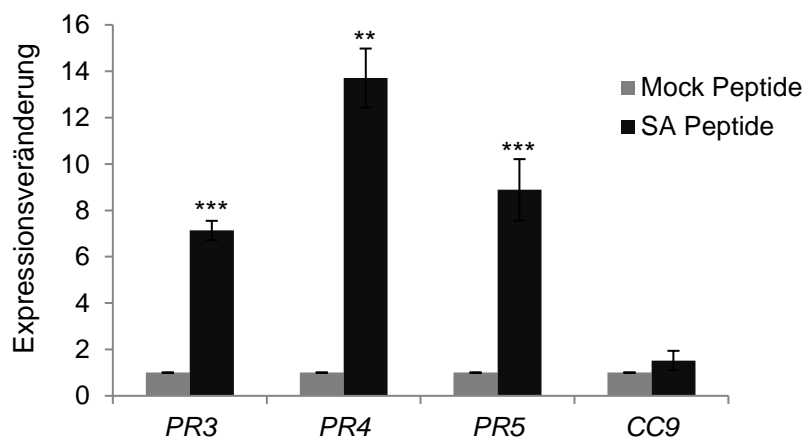


Abb. 4. Peptidfraktion von apoplastischem Fluid SA-behandelter Pflanzen induziert SA-abhängige *PR*-Genexpression. Die Blätter naiver Maiskeimlinge wurden mit der Peptidfraktion aus apoplastischem Fluid Mock-/SA-behandelter Pflanzen infiltriert und nach 24h via qRT-PCR analysiert. Relative Expression wurde gegen *GAPDH* normalisiert (Barber *et al.*, 2005). Die Expression von „Mock Peptid“-behandelten Blättern wurde auf „1“ gesetzt. Dabei zeigte sich eine signifikante Induktion SA-assoziiierter Gene (*PR3*, *PR4* und *PR5*) im Vergleich zur Kontrolle. Das JA-Markergen *CC9* zeigte keine differenzielle Expression. Das Experiment wurde in drei unabhängigen biologischen Replikaten mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. **, $p \leq 0.005$; ***, $p \leq 0.0005$.

2.2 Identifizierung eines apoplastischen Signalpeptids

In Zusammenarbeit mit Dr. Farnusch Kaschani (Universität Essen-Duisburg, DE) und Dr. Karina van der Linde (Stanford University, USA) konnte durch massenspektrometrische Analysen der Peptidfraktion SA-behandelter Blätter eine Vielzahl apoplastischer Peptide identifiziert werden. Für die Auswahl möglicher Peptide, die für die in Abb. 4 gezeigte SA-assoziierte *PR*-Genexpression verantwortlich sind, wurden zunächst Peptide ausgewählt, die mit höherem Score in SA-Fluid im Vergleich zur Kontrolle detektiert wurden. Mithilfe einer anschließenden BLAST-Analyse (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997) gegen das Maisgenom sollten die zu den Peptiden gehörigen Vorläufer-Proteine identifiziert werden. Um die Liste möglicher Kandidatenpeptide weiter einzugrenzen, wurden nur diejenigen Proteine als interessant erachtet, die bisher nicht charakterisiert wurden und möglichst keine bekannten funktionellen Domänen aufwiesen. Ebenfalls wurde eine SignalP (Nielsen *et al.*, 1997) und SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2004; Bendtsen *et al.*, 2005) Analyse durchgeführt. Dieserart konnte einer der Kandidaten als „unkonventionell“ sekretiert vorhergesagt werden (Anhang Abb. S7).

Für die Untersuchung der potenziellen *PR*-Gen-induzierenden Wirkung einer oder mehrerer Kandidatenpeptide wurden die in Anhang Tab. S1 gezeigten Peptide synthetisiert und anschließend *in vivo* getestet. Blätter ca. 10 Tage alter Maispflanzen wurden mit jeweils 5µM Peptidlösung, bzw. 2mM SA als Positivkontrolle, behandelt. Nach 24h Inkubation wurde der Bereich 2-4 cm oberhalb der Infiltrationsstelle zur RNA-Isolation ausgeschnitten und mittels qRT-PCR analysiert (Abb 5A). Für die Analyse wurden die bekannten Markergene *PR3* (GRMZM2G145518), *PR4* (GRMZM2G117971), *PR5* (GRMZM2G402631), *PRm6b* (GRMZM2G065585) und *PR10* (GRMZM2G112488) herangezogen (Doehlemann *et al.*, 2008; Dolezal *et al.*, 2014; Ray *et al.*, 2016; van der Linde *et al.*, 2012a). Für das Kandidatenpeptid 1 [+EGESELK LATQGASVRR] konnte eine transkriptionelle Induktion SA-assoziiierter Markergene verzeichnet werden (Abb. 5B, Anhang Abb. S1). Aufgrund der Eigenschaft die Expression SA-assoziiierter Markergene zu induzieren, wurde das Kandidatenpeptid 1 als Zip1 (engl. *Zea mays immune signaling peptide 1*) bezeichnet. Interessanterweise unterscheiden sich Zip1 und SA behandelte Maisblätter im Transkriptionsprofil der getesteten *PR*-Gene nicht signifikant (Abb. 5B).

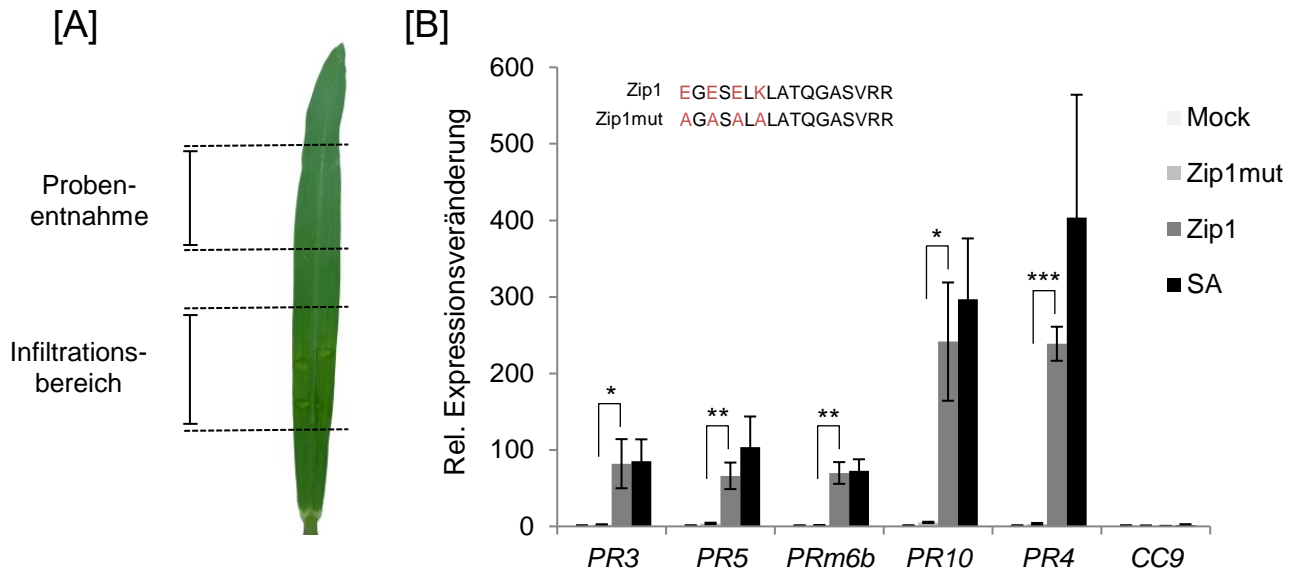


Abb. 5. Zip1 induziert die Expression SA-assoziiierter Abwehrgene. [A] Maisblätter wurden unterhalb des Blattmittelpunkts infiltriert. Die Probenentnahme erfolgte 2-4 cm über der Infiltrationsstelle. [B] qRT-PCR Analyse Zip1- (grau) und SA- (schwarz) behandelter Maisblätter zeigt die Induktion SA-assoziiierter Markergene, wohingegen Zip1Mut Behandlung keine Induktion hervorrief. Relative Expression wurde gegen *GAPDH* normalisiert (Barber *et al.*, 2005). Die Expression von Kontrollblättern wurde auf „1“ gesetzt. Das Experiment wurde in mindestens fünf unabhängigen biologischen Replikaten mit ähnlichen Ergebnisse durchgeführt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.005$; ***, $p \leq 0.0005$

2.2.1 Die biologische Aktivität von Zip1 ist Sequenz-spezifisch

Sequenzanalysen von Zip1 und seinem vorhergesagten Vorläuferpeptid PROZIP1 mittels BLASTp ergaben keinerlei homologe Proteine in verwandten Pflanzenspezies. Um demnach Rückschlüsse auf mögliche funktionelle Aminosäurereste schließen zu können, wurden die biochemischen Eigenschaften von Zip1 untersucht. Dazu wurde das Peptid mithilfe des *Peptide Property Calculators* von Innovagen® (www.pepcalc.com) (Lear *et al.*, 2016) analysiert und mit anderen ausgewählten, bekannten Signalpeptiden und Peptidelizitoren verglichen. Abb. 6 zeigt einen Vergleich der biochemischen Eigenschaften von Zip1, elf18 (Zipfel *et al.*, 2006) und ZmPep2 (Huffaker *et al.*, 2013). Dabei fällt auf, dass alle drei Peptide einen stark hydrophilen N-Terminus haben (Abb. 6). Der N-Terminus von Zip1 ist mit Glutaminsäure an Position 1, 3 und 5 eher sauer, wohingegen sowohl ZmPep2 als auch elf18 einen basischen N-Terminus aufweisen. Um einen eventuellen Einfluss der hydrophilen Reste auf die biologische Aktivität von Zip1 zu untersuchen, wurden diese durch die neutrale Aminosäure Alanin

substituiert. Das resultierende Peptid Zip1mut wurde anschließend im Vergleich zu nativen Zip1 in Maisblätter infiltriert und die *PR*-Geninduktion mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 5B). Dabei zeigte sich, dass Zip1mut im Gegensatz zu Zip1 nur eine geringfügige, jedoch nicht signifikante, Induktion untersuchter *PR*-Gene verursacht. Dies deutet darauf hin, dass die N-terminalen Aminosäuren mit ihren hydrophilen Eigenschaften eine Rolle in der Zip1-vermittelten Induktion der *PR*-Genexpression spielen. Zip1mut wurde auf Basis dieser Erkenntnisse in folgenden Experimenten als Negativkontrolle verwendet werden.

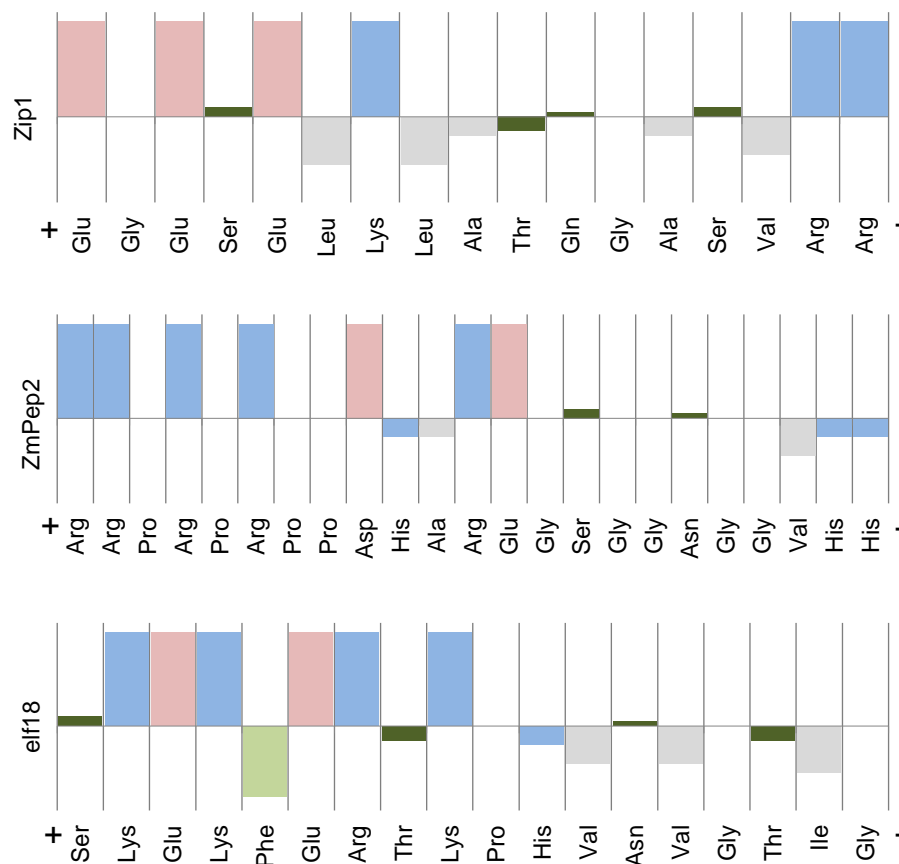


Abb. 6. Untersuchung der biochemischen Eigenschaften von Zip1. Die mittels PepCalc durchgeführte Analyse zu den biochemischen Eigenschaften von Zip1, ZmPep2 und elf18 zeigte für alle drei Peptide einen hydrophilen N-Terminus, wohingegen der C-terminale Teil neutral ist. Der N-Terminus von ZmPep2 und elf18 bekommt in diesem Bereich durch Arginine und Lysine basische Eigenschaften. Zip1 dagegen weist einen vornehmlich sauren N-Terminus auf. Farbsäule oberhalb: Hydrophil; Farbsäule unterhalb: Hydrophob; Rot: Sauer; Blau: Basisch; hellgrün: Aromatisch; Grau: Aliphatisch; dunkelgrün: Polar.

2.3 Untersuchung Zip1-abhängiger Abwehrreaktionen

2.3.1 Zip1 aktiviert apoplastische PLCPs

Die in 2.1 und 2.2 gezeigten *PR*-Geninduktion durch Zip1 deutet darauf hin, dass das Peptid einen ähnlichen Signalweg wie SA aktiviert (vgl. Abb. 5). Da SA für die Aktivierung apoplastischer PLCPs in Mais verantwortlich ist (van der Linde *et al.*, 2012a), lag ebenfalls die Vermutung nahe, dass Zip1 Einfluss auf die Aktivierung dieser PLCPs haben könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine aktivitätsbasierte Protein Markierung (engl. *Activity-based protein profiling*; ABPP) (Cravatt *et al.*, 2008) mithilfe der Cysteinprotease-spezifischen Sonde DCG-04 durchgeführt. Bei DCG-04 (Greenbaum *et al.*, 2000) handelt es sich um ein biotinyliertes E-64 Derivat, welches kovalent im aktiven Zentrum von Cysteinproteasen bindet. Durch den Biotinrest der Sonde ist die Detektion aktiver Cysteinproteasen über Immunodetektion möglich (Greenbaum *et al.*, 2000). Abb. 7A zeigt das Ergebnis von ABPP-Experimenten Zip1- und Zip1mut-behandelter Blätter. Demnach induzierte Zip1 die Aktivität apoplastischer Cysteinproteasen in gleicher Weise wie SA, wohingegen Zip1mut im Vergleich eine nahezu vollständig reduzierte Aktivität aufwies. Die Beobachtung korreliert mit den in Abschnitt 2.2 gezeigten qRT-PCR Daten. Die biologische Aktivität von Zip1mut ist demnach nicht komplett, jedoch signifikant im Vergleich zu nativem Zip1 reduziert (vgl. Abb. 5).

Nachfolgend wurde getestet, ob Zip1 PLCPs direkt durch Interaktion mit einer möglichen *exosite* (Jabaiah *et al.*, 2012) der Proteasen oder indirekt über einen bisher unbekannten Mechanismus aktiviert. Dazu wurde Blattextrakt aus Mock- (Kontrollextrakt), Zip1mut-, Zip1- und SA-behandelten Blättern hergestellt und *in vitro* mit 1 μ M Zip1 für 60 Minuten inkubiert. Bei einer direkten Interaktion wäre eine Aktivierung von PLCPs im Kontrollextrakt zu erwarten. Es zeigte sich jedoch kein direkter Einfluss auf die Proteaseaktivität durch Zip1 (Abb. 7B). Dies deutet auf eine indirekte Aktivierung über bisher unbekannte Signaltransduktionswege hin, die vergleichbar mit der SA-abhängigen PLCP Aktivierung sind (van der Linde *et al.*, 2012). Zusammenfassend bekräftigen die hier gezeigten Ergebnisse, dass es sich bei Zip1 um ein Peptidsignal handelt, das Teil der maisspezifischen, SA-abhängigen Immunantwort ist.

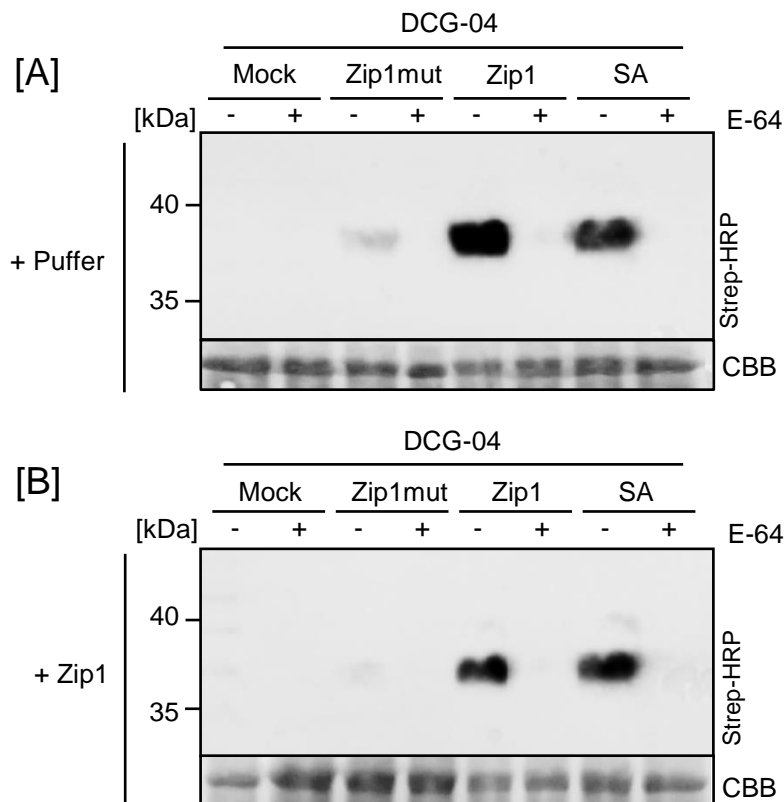


Abb. 7. Zip1 induziert PLCP Aktivität. [A] Nach Peptid- und SA-Behandlung wurde mittels Aktivitäts-basierter Proteinmarkierung mit DCG-04 die Induktion apoplastischer PLCPs visualisiert. Dabei zeigte sich eine gleichermaßen starke Aktivierung durch Zip1 und SA, wohingegen Zip1mut eine um das 10-fach reduzierte Aktivität zeigt. Die relative Bandenintensität wurde mit ImageJ (Hartig, 2013) bestimmt. [B] Blattextrakt Mock-behandelter Blätter wurde *in vitro* mit Zip1 inkubiert. Dabei zeigte sich keine PLCP-Aktivierung. Die DCG-04 Markierungen wurden in mindestens drei biologischen Replikaten mit jeweils ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

2.3.2 Zip1 induziert keine PTI-abhängigen Immunreaktionen

Neben der *PR*-Geninduktion und der nachgewiesenen Aktivierung von PLCPs, sollte im Weiteren getestet werden, ob die Zip1-Perzeption vergleichbare PTI-Reaktionen auslöst, wie sie beispielsweise für Chitin, elf18 oder flg22 bekannt sind (Felix *et al.*, 1999; Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007; Zipfel *et al.*, 2006; Zipfel *et al.*, 2004). Dazu wurde in Kolaboration mit Prof. Dr. Cyril Zipfel und Dr. Nicholas Holton (The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK) sowohl die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies als auch die Aktivierung von MAP-Kinasesignalwegen nach Zip1-Behandlung untersucht. Maisblattscheiben wurden mit Zip1 und den bekannten PTI-Elizitoren flg22 und Chitin behandelt und nachfolgend die Entstehung von ROS im Zuge eines *oxidative burst* gemessen (Abb. 8A). Es konnte gezeigt werden, dass der *oxidative burst* wenige Minuten nach Zugabe von 1 μ M flg22 bzw. 1 μ M Chitin das Maximum erreichte und über 20 Minuten hinweg andauerte. Der durch Chitin

ausgelöste *oxidative burst* fiel dabei stärker als durch flg22-Behandlung aus. Die Zugabe von 5 μ M Zip1 zeigte jedoch genauso wie die Kontrolle keine messbare Produktion von ROS. Um den möglichen Einfluss von Zip1 auf weitere, typische PTI-Reaktionen zu analysieren, wurden nachfolgend MAPK-Aktivierungsassays durchgeführt.

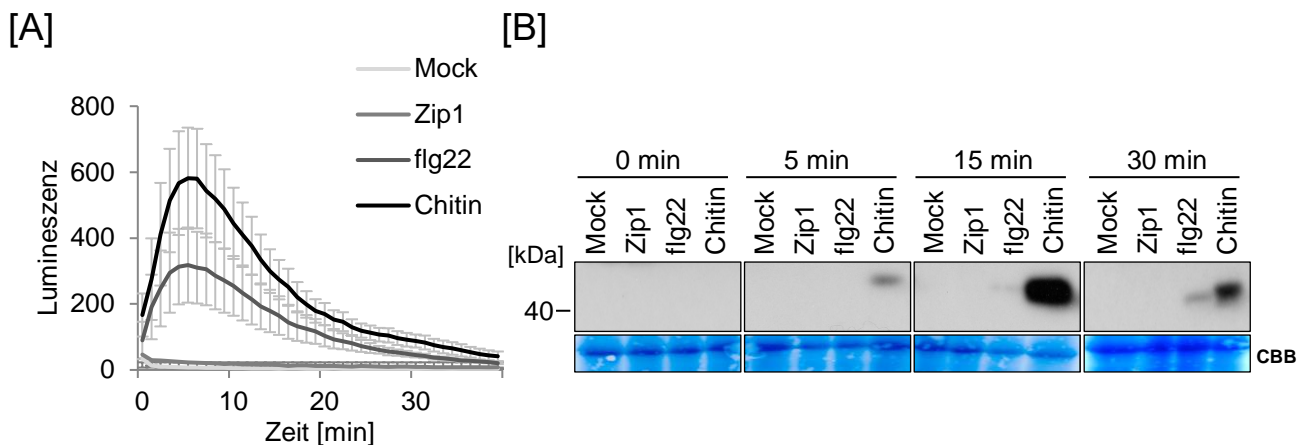


Abb. 8. Zip1 induziert keine typischen PTI Reaktionen. [A] Luminol-basierte Messung der ROS-Produktion in Reaktion auf 5 μ M Zip1, 1 μ M flg22 und 1 μ M Chitin. Zip1-behandelte Blattscheiben zeigten keine messbare ROS Produktion. Die bekannten PTI Elizitoren Chitin und flg22 induzierten die Produktion von ROS in unterschiedlichen Intensitäten. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten. [B] Immunoblot-basierte Visualisierung der MAPK-Aktivierung durch Zip1, Chitin und flg22. Im Gegensatz zu flg22 und Chitin wurde die MAPK-Aktivierung durch Zip1 nicht induziert. Das Experiment wurde in zwei biologischen Replikaten mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Die Perzeption von PAMPs/MAMPs durch PRRs führt zum raschen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen (Seybold *et al.*, 2014). Diese Ereignisse haben zur Folge, dass stromabwärts liegende MAPK-Kaskaden durch Phosphorylierung aktiviert werden und schlussendlich Abwehr-assoziierte Reaktionen induzieren (Couto und Zipfel, 2016). Diese Phosphorylierung kann nach Elizitorbehandlung durch Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen Phosphatreste der aktivierten MAPK-Komponenten nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2015). In der Modellpflanze *A. thaliana* handelt es sich um MAPK3, MAPK4 und MAPK6, die durch die Erkennung von flg22, elf18 oder Chitin aktiviert werden und stromabwärts liegende Signalkaskaden aktivieren (Beckers *et al.*, 2009; Felix *et al.*, 1999; Kaku *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2017; Zipfel *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde getestet, ob die PAMPs ebenfalls bei Mais MAPK-Kaskaden induzieren und ob Zip1 einen Einfluss auf diese Abwehr-assoziierten MAPKs hat. Dazu wurden Blattscheiben mit 5 μ M Zip1 und 1 μ M Chitin bzw. 1 μ M flg22 behandelt und zu den Zeitpunkten 0, 5, 15 und 30 Min

analysiert (Abb. 8B). Unter Verwendung eines Phospho-p42/44-MAPK-Antikörpers zeigte der Immunoblot keine Aktivierung der bekannten MAPKs durch Zip1. Dahingegen erfolgte eine Aktivierung durch Chitin und – analog zu den ROS-Assays – in schwächerer Form durch flg22. Bei *A. thaliana* und *N. benthamiana* induzieren Chitin und flg22 die Phosphorylierung von MAPK3/4/6 (Asai *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte für Mais in dieser Arbeit die Aktivierung nur einer der drei MAPKs durch Chitin und flg22 nachgewiesen werden (Abb. 8B).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Zip1-abhängigen Signaltransduktion verdeutlichen, dass es sich bei Zip1 um ein SA-assoziiertes Signalmolekül handelt, das im Gegensatz zu bekannten PAMPs/DAMPs weder messbare Produktion von ROS, noch Phosphorylierungen von bekannten PTI-assoziierten MAPKs induziert.

2.4 Biochemische Untersuchung von PROZIP1

Durch Sequenzanalysen (BLASTp, Altschul *et al.*, 1997; ExPasy PROSITE, Sigrist *et al.*, 2012) des Vorläuferproteins von Zip1, PROZIP1, konnten keine bekannten funktionellen Domänen identifiziert werden. Es fiel jedoch auf, dass sich innerhalb der PROZIP1 Aminosäuresequenz insgesamt fünf Arg-Arg (RR) und ein Phe-Arg (FR) Motiv(e) befinden, die potenzielle Papain- und Serinproteaseschnittstellen sind (Abb. 9) (Choe *et al.*, 2006; Paireder *et al.*, 2016; Srivastava *et al.*, 2009). Auf Basis dieser Erkenntnis wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Karina van der Linde ein Protease Aktivitätstest von apoplastischem Fluid SA-behandelter Maisblätter mit unterschiedlichen Substraten (Z-Phe-Arg-AMC, Z-Arg-Arg-AMC, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die SA-aktivierten PLCPs im apoplastischen Fluid von Mais favorisiert Arg-Arg-AMC- und Phe-Arg-AMC-Fluoreszenzsubstrate prozessieren (Anhang Abb. S2). Durch die Zugabe von E-64 konnte die beobachtete PLCP-Aktivität spezifisch gehemmt werden. Durch Mutagenese wurde eine PROZIP1-Variante hergestellt, bei der alle potenziellen Proteaseerkennungsequenzen durch Alanin ersetzt sind (PROZIP1mut^{CS} = PROZIP1 mutated cleavage sites) (Abb. 9).

```

PROZIP1      1  MVKRLGSRTRHGWSWSFGRLEGEARRAALGKTEPADRTWDQVASAREQARRQGKARSERA
PROZIP1MutCS 1  MVKRLGSRTRHGWSWSFGRLEGEAAAAALGKTEPADRTWDQVASAREQAAAQGKARSERA
                *****
                *****

PROZIP1      61  GERERAAGRREIQAPSVEFRRARQPWEGESELKLATQGASVRRNRTGTQGEEEGDAVAQ
PROZIP1MutCS 61  GERERAAGAAEIQAPSVEAAAAARQPWEGESELKLATQGASVAAANRTGTQGEEEGDAVAQ
                *****
                *****

PROZIP1      121 EDGWAEEDRGERRLDF
PROZIP1MutCS 121 EDGWAEEDRGEAALDF
                *****
                ***

```

Abb. 9. Vergleich der Aminosäuresequenzen von PROZIP1 und dem in dieser Arbeit generierten PROZIP1mut^{CS}. Potenzielle Proteaseschnittstellen mit den Aminosäuren Arg-Arg oder Phe-Arg sind rot markiert. Durch Substitution zu Ala mutierte Schnittstellen sind blau markiert. Zip1 ist grün hinterlegt.

2.4.1 Aufreinigung von PROZIP1 und PROZIP1-Varianten

Die Voraussetzung für *in vitro* Untersuchungen von PROZIP1 war die heterologe Herstellung und Aufreinigung des Proteins. Dafür wurden PROZIP1 und die mutierte Version PROZIP1mut^{CS} (Abb. 10) mit einer N-terminalen Glutathion-S-Transferase-Fusion (GST) in *E. coli* hergestellt und anschließend über Affinitätschromatographie gereinigt. Mithilfe der PreScission®-Protease konnte die GST-Fusion schließlich abgespalten und das Protein via Gelfiltration aufbereitet werden (Abb. 10). Für Immunobot-Analysen wurden beide PROZIP1-Varianten zusätzlich mit einem N-terminalem HA-Tag fusioniert, was in Molekulargewichten von 16,6 kDa (PROZIP1) und 15,5 kDa (PROZIP1mut^{CS}) resultierte.

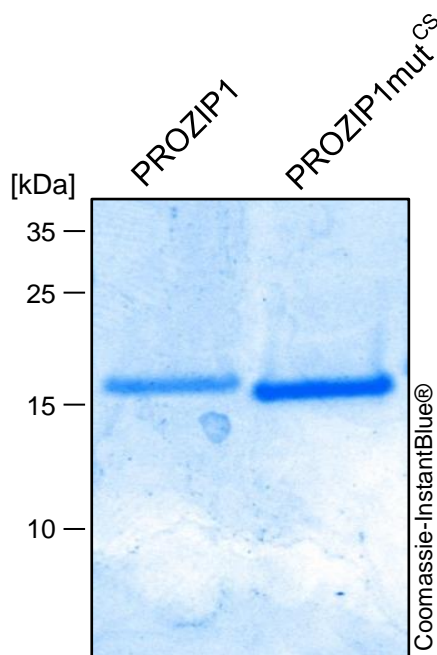


Abb. 10. Heterologe Herstellung von PROZIP1 und PROZIP1mut^{CS}. Coomassie-InstantBlue®-gefärbte SDS-PAGE von aufgereinigtem PROZIP1 und PROZIP1mut^{CS}. Beide Proteine wurden mit N-terminaler GST-Fusion in *E. coli* exprimiert und aus dem löslichen Überstand des *E. coli* Proteinextrakts über GST-Sepharose aufgereinigt. Über PreScission®-Protease Behandlung wurde GST anschließend proteolytisch entfernt. Anschließend erfolgte eine weitere Reinigung der Proteine über Gelfiltration.

2.4.2 SA-aktivierte Mais PLCPs prozessieren PROZIP1

Für die Untersuchung einer möglichen Prozessierung von PROZIP1 durch PLCPs wurden in Zusammenarbeit mit Beyda Acar im Rahmen ihrer Bachelorarbeit *in vitro* Prozessierungsexperimente durchgeführt. Zur Visualisierung der PLCP-Aktivität im apoplastischen Fluid SA-behandelter Pflanzen wurde zunächst eine DCG-04 Markierung vorgenommen. (Abb. 11A). Dabei konnte die SA-vermittelte Induktion der PLCP-Aktivität bestätigt werden. Das Fluid mit aktiven PLCPs wurde anschließend zusammen mit 5 μ M PROZIP1 für 15 Minuten inkubiert, wobei je nach 0 min, 5 min und 15 min Proben entnommen wurden. Durch darauffolgenden Immunoblot gegen die N-terminale HA-Fusion von PROZIP1 konnte der Abbau des Proteins nachgewiesen werden. Dabei wurde eine Abnahme des PROZIP1-spezifischen Signals über die Zeit dokumentiert (Abb. 11B). Der beobachtete Abbau konnte durch Vorinkubation der PLCPs mit E-64 inhibiert werden. Somit kann das Prozessierungsereignis des Zip1-Vorläuferproteins auf die Aktivität der SA-induzierten PLCPs zurückgeführt werden (Abb. 11B). Gleicheweise konnte für PROZIP1mut^{CS} keine Prozessierung nachgewiesen werden. Die Aminosäure-Substitutionen der potenziellen Prozessierungssequenzen haben zur Folge, dass die hydrolytische Spaltung von PROZIP1mut^{CS} durch SA-aktivierten PLCPs ausbleibt (Abb. 11B).

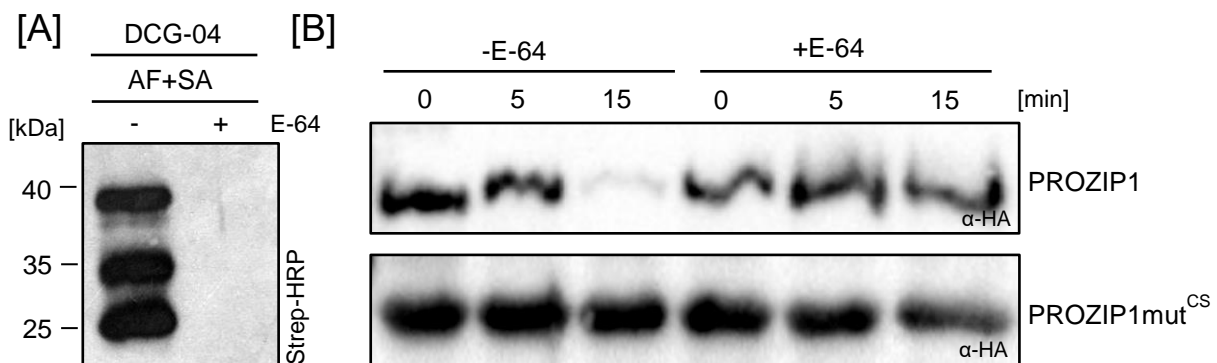


Abb. 11. Prozessierungsexperiment von PROZIP1 mit PLCPs aus apoplastischem Fluid. [A] DCG-04-Markierung von apoplastischem Fluid SA-behandelter Pflanzen zeigte die Aktivierung von PLCPs, die spezifisch durch E-64 blockiert und dadurch für DCG-04 unzugänglich gemacht werden konnten. [B] Aufgereinigtes PROZIP1 und PROZIP1mut^{CS} wurden mit apoplastischem Fluid inkubiert. Eine Prozessierung konnte über die angezeigte Zeit von 0 min, 5 min und 15 min durch Abnahme des α -HA Immunoblotssignals nachgewiesen werden und zeigte eine Prozessierung von PROZIP1 (oberer Blot), nicht aber von PROZIP1mut^{CS} (unterer Blot). Die Reaktion ist mit E-64 inhibierbar und bestätigt eine spezifische Prozessierung durch Cysteinproteasen.

Um herauszufinden, welche Mais PLCPs PROZIP1 spalten können, wurden die Proteasen CP1, CP2, XCP2 und CatB mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation heterolog in *Nicotiana benthamiana* exprimiert. Eine anschließende Normalisierung der Proteaseaktivität sollte gewährleisten, dass vergleichbare Aktivitätslevel der Proteasen bei den Experimenten eingesetzt werden. Sowohl die Expression der PLCPs als auch die Normalisierung der Aktivität wurde mittels ABPP nachgewiesen (Abb.12A). In diesem Fall erfolgte die Visualisierung der PLCPs über die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sonde MV-202 (Abb. 12A) (Lu et al., 2015). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit (98%) von CP1A und CP1B wurde in dieser Arbeit CP1A (CP1) repräsentativ für beide PLCPs verwendet.

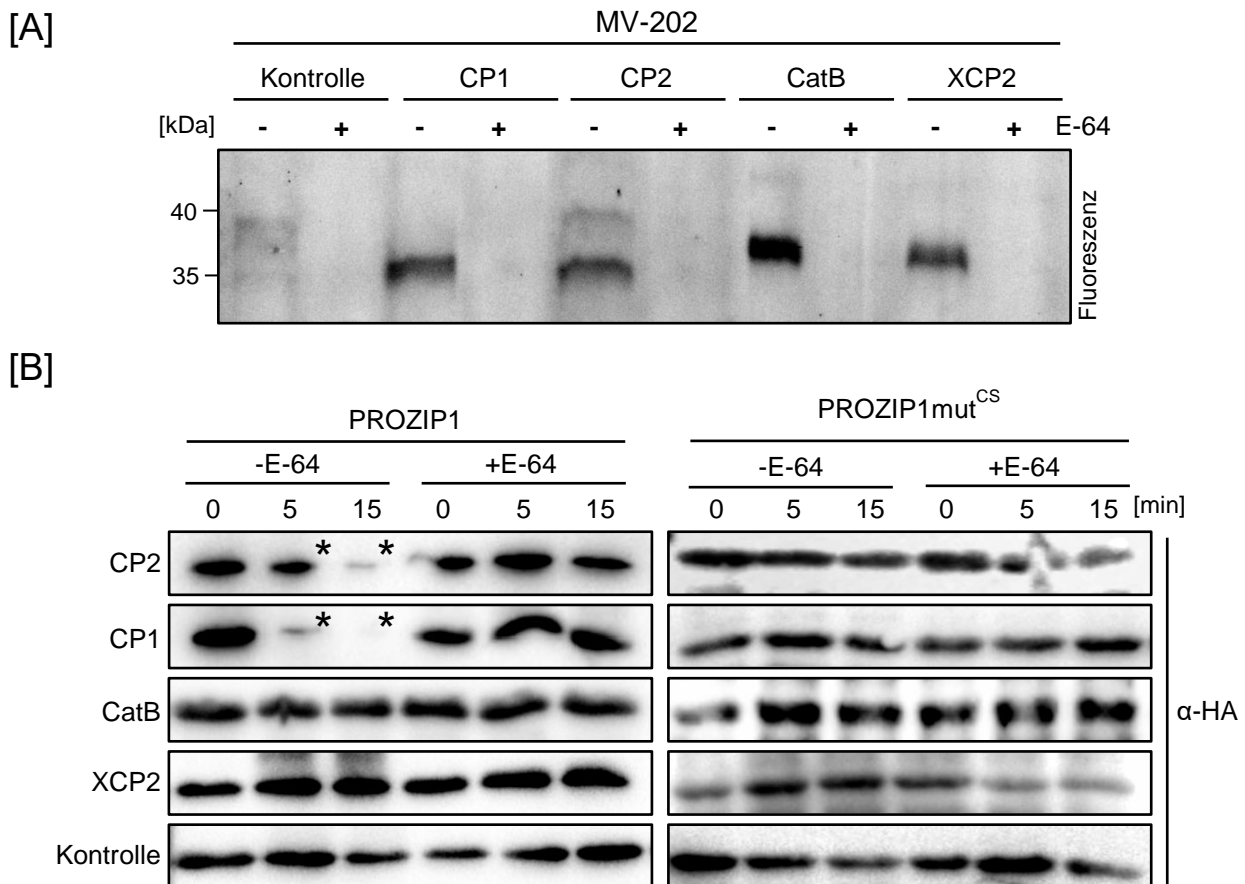


Abb. 12. Prozessierungsassay von PROZIP1 mit den individuellen PLCPs CP1, CP2, CatB und XCP2. [A] Durch die Sonde MV-202 markierte Mais-PLCPs, die heterolog via *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation in *N. benthamiana* exprimiert wurden. Die Normalisierung der Aktivität aller Proteasen wurde mittels ABPP überprüft. Dabei zeigte sich kaum Aktivität im Kontrollfluid, wohingegen die Aktivitäten von CP1 (35 kDa), CP2 (33 kDa), CatB (38 kDa) und XCP2 (36 kDa) der Normalisierung entsprechend gleich war. Die Aktivität lässt sich spezifisch durch E-64 inhibieren. [B] Prozessierungsexperimente mit individuellen Proteasen und anschließender α-HA Immunoblot demonstrierten die spezifische Prozessierung von PROZIP1 durch CP1 und CP2 über die Zeit (mit * markiert), nicht aber durch CatB und XCP2. PROZIP1mut^{CS} wurde nicht prozessiert.

Nach der *in vitro* Markierung aktiver Proteasen und anschließender SDS-PAGE konnte für CP1 (35 kDa), CP2 (33 kDa), CatB (38 kDa) und XCP2 (36 kDa) ein Fluoreszenzsignal auf der erwarteten Höhe detektiert werden (Abb. 12A). Ebenso zeigte die Kontrolle (Leervektor) kaum Aktivität endogener Tabak-PLCPs, sodass die Proteaseaktivität auf die heterolog exprimierten Mais PLCPs zurückzuführen war. Ebenso war die Fluoreszenzintensität - und somit die Aktivität - aller Proteasen vergleichbar. Für die Experimente wurde daraufhin aufgereinigtes PROZIP1 und PROZIP1mut^{CS} mit den in *N. bethamiana* exprimierten und normalisierten Proteasen inkubiert. Eine Prozessierung wurde analog zu Abb. 11B über α -HA Immunoblot und Signalreduktion über die Zeit nachgewiesen (Abb. 12B). Bei den Ergebnissen wird ersichtlich, dass PROZIP1 effizient durch die Proteasen CP1 und CP2, nicht aber durch XCP2 und CatB prozessiert wurde. Da die Aktivität beider Proteasen in den Ansätzen vergleichbar war, scheint die Prozessierung durch CP1 im direkten Vergleich mit CP2 effizienter ausgefallen zu sein. Des Weiteren konnte kein Abbau von PROZIP1mut^{CS} nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Prozessierung des Vorläuferpeptids PROZIP1 Protease-spezifisch verläuft und CatB und XCP2 nicht an der proteolytischen Spaltung des Proteins beteiligt sind. PROZIP1 ist somit ein Substrat der beiden SA-aktivierten apoplastischen PLCPs CP1 und CP2. Außerdem wird die Substratspezifität durch die Aminosäuresequenzen Arg-Arg und Phe-Arg vermittelt.

2.4.3 Die Prozessierung von PROZIP1 durch PLPCs setzt aktives Zip1 frei

Da in den vorherigen Versuchen aus 2.4.2 keine Spaltprodukte im Immunoblot nachgewiesen werden konnten und somit keine Aussage über die genaue Prozessierung von PROZIP1 gemacht werden kann, wurde im Folgenden untersucht, ob die Signalabnahme im Immunoblot tatsächlich mit einer Prozessierung einhergeht, die zur Freisetzung des biologisch aktiven Zip1 führt.

Dazu wurde apoplastisches Fluid SA-behandelter Blätter mit aufgereinigtem PROZIP1 inkubiert und nachfolgend die Protein- und Peptidfraktionen voneinander getrennt. Um zu gewährleisten, dass natives Zip1 im Fluid SA-behandelter Pflanzen keinen Einfluss auf die Ergebnisse nimmt, wurde das apoplastische Fluid nach Isolation mittels Anionen-Austausch-Chromatographie fraktioniert (Anhang Abb. S3).

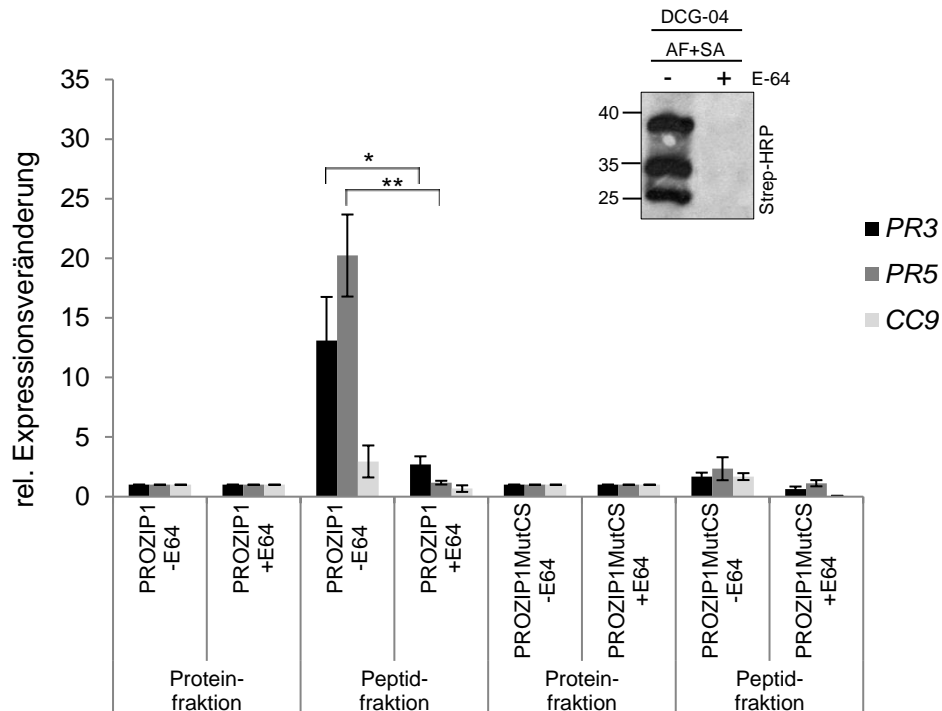


Abb. 13. Das durch PLCPs *in vitro* freigesetzte Zip1 ist *in vivo* aktiv. Um das Ergebnis der Prozessierungsassays mit einer Freisetzung des biologisch aktiven Zip1 zu korrelieren, wurde PROZIP1 *in vitro* mit SA-aktivierten PLCPs inkubiert. Die Aktivität der PLCPs wurde mittels DCG-04-basierendem ABPP visualisiert (Immunoblot). Maisblätter wurden anschließend jeweils mit Protein- und Peptidfraktionen (<10kDa) der Prozierungsassays behandelt. Nach 24h wurden die behandelten Blätter mittels qRT-PCR analysiert. Dabei konnte eine Induktion der SA-Markergene *PR3* und *PR5* durch Peptidfraktionen gemessen werden, die durch Inhibition der PLCPs nicht erfolgte. Ebenso ist keine differenzielle Genexpression durch Proteinfraktionen ersichtlich. Der Versuch wurde in drei unabhängigen biologischen Replikaten mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.005$.

So konnten endogene Peptide entfernt und die Proteasen ankonzentriert werden.

Die PLCP-enthaltenen Fraktionen (van der Linde *et al.* 2012a, Mueller *et al.* 2013) wurden vereinigt und die Proteasaktivität mittels ABPP bestätigt (Abb. 13, Immunoblot). Nach der Inkubation von PROZIP1 und angereicherten PLCPs wurden Maisblätter separat mit Protein- und Peptidfraktion der Prozessierungsansätze behandelt. Die nach 24 h durchgeführte qRT-PCR zeigte bei mit Peptidfraktionen von Prozessierungsversuchen mit apoplastischem Fluid und PROZIP1 behandelten Blättern eine transkriptionelle Induktion der SA-Markergene *PR3* und *PR5* um das 13- bzw. 20-fache im Vergleich zur Proteinfraktion (Abb. 13). Durch Inhibition der Proteasen mit E-64 wurde die Induktion der *PR*-Genexpression in Peptidfraktionen signifikant inhibiert (Abb. 13). PROZIP1mut^{CS} Peptidfraktionen hatten keinen Einfluss auf die differenzielle Expression der *PR*-Gene (Abb. 13), was die Beobachtungen aus 2.4.2 und 2.4.3 bestätigte. PROZIP1mut^{CS} entzieht sich durch die Mutation der

Erkennungssequenzen einer Proteolyse durch die PLCPs. Eine differenzielle Expression für CC9 ist in keiner der Experimente zu beobachten.

Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass die in 2.4.2 beobachtete Prozessierung von PROZIP1 durch PLCPs das biologisch aktive Zip1 freisetzt.

2.5 Zip1 fungiert als vollständiges SA-Signal

2.5.1 Transkriptionsanalyse SA- und Zip1-behandelter Maisblätter

Die qRT-PCR Experimente mit Zip1-behandelten Maisblätter zeigten die Induktion von fünf SA-assoziierten Abwehrgenen (Abb. 5B). Um die transkriptionelle Antwort der Maispflanzen auf Zip1 detaillierter zu untersuchen, wurden Maisblätter mit 5 μ M Zip1 behandelt. Zum Vergleich wurden Blätter mit 2 mM SA infiltriert. 24 h nach Behandlung wurde RNA isoliert und eine Transkriptomanalyse mittels Illumina RNA-*sequencing* (RNAseq) durchgeführt.

Die Transkriptomanalyse zeigte 24 h nach Behandlung eine differenzielle Expression von 2980 (Zip1) und 2713 (SA) Genen im Vergleich zur Puffer-infiltrierten Kontrolle (Mock). In einer weiteren Analyse wurden die durch Zip1- und SA-Behandlung induzierten und reprimierten Gene (im Vergleich zu Mock) miteinander verglichen (Abb. 14A). Es wurden die am stärksten induzierten/reprimierten Gene über/unter einem logFC-Schwellenwert von $\sim \pm 1.6$ in Betracht gezogen. Dabei zeigte sich, dass 266 (89%) der Top300 induzierten Gene SA-behandelter Pflanzen mit denen von Zip1-behandelten Proben übereinstimmten (Abb. 14A). Vergleicht man die Top50 reprimierten Gene SA-behandelter Pflanzen mit Zip1-behandelten Proben, waren 43 (86%) übereinstimmend (Abb. 14A). Umgekehrt waren 268 (89%) der durch Zip1 Top300 induzierten Gene auch durch SA induziert, wohingegen 36 (72%) der durch Zip1 Top50 reprimierten Gene auch in SA-behandelten Proben reprimiert waren (Abb. 14A). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Zip1 stimulierte Signalprozesse weitgehend mit denen von SA überlappen.

Um im Weiteren anhand der RNAseq-Daten die zellulären Prozesse zu untersuchen, die durch Zip1 reguliert sind, wurde *Gene Ontology* (GO) (The Gene Ontology Consortium, 2000) zu Hilfe genommen. Der sogenannte GO-Zusammenschluss hat sich zum Ziel gesetzt eine bioinformatische Datenbank zu erzeugen, in der das sich stetig wachsende Wissen über Gen- und Proteinfunktionen aller Eukaryoten in Ontologien beschrieben werden kann.

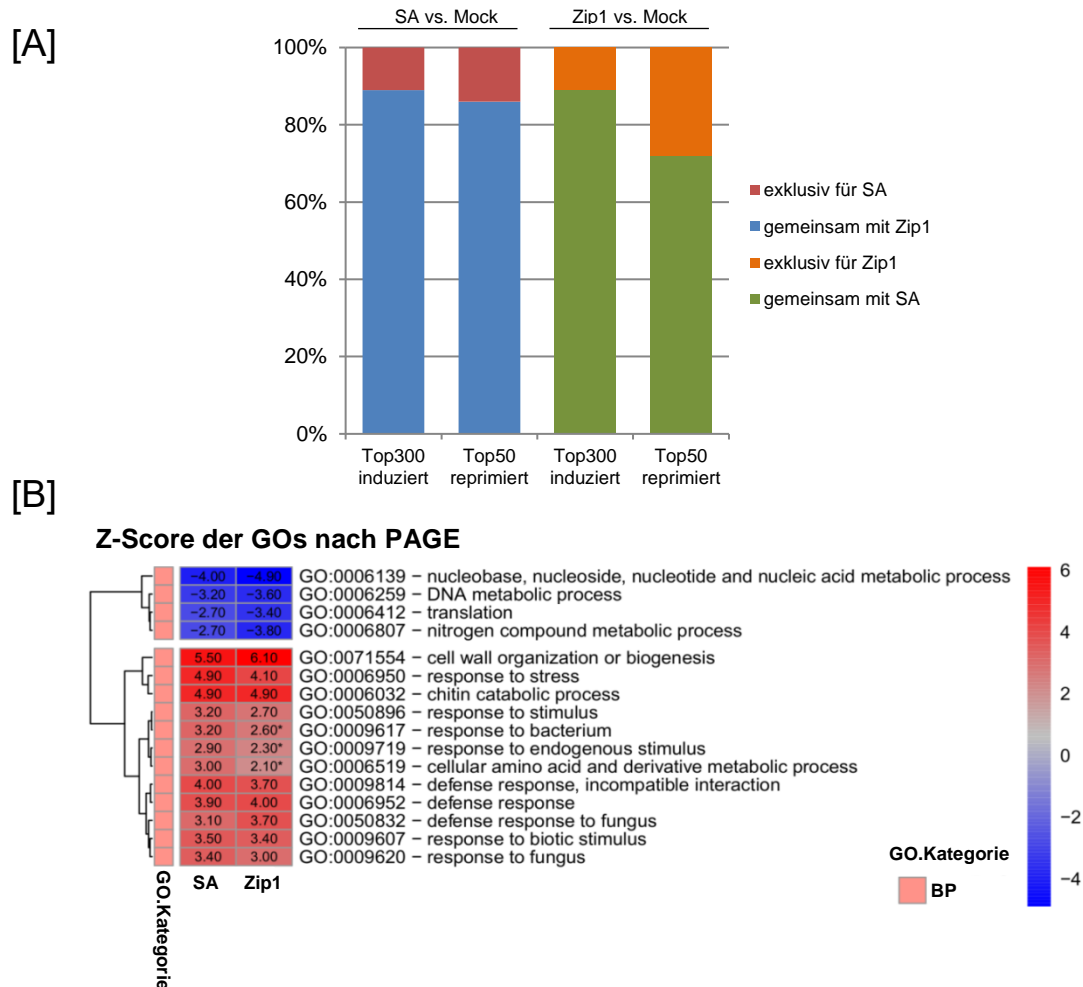


Abb. 14. RNAseq-Analyse Zip1-behandelter Maisblätter. [A] Geteilte Genexpression Zip1- und SA-behandelter Pflanzen in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Top300 induzierten Gene für Zip1-behandelte Pflanzen deckten sich zu 89% (266) mit den Top300 induzierten Genen SA-behandelter Pflanzen und umgekehrt (89%; 268). Die Top50 reprimierten Gene Zip1-behandelter Pflanzen überlappten zu etwa 72% mit denen SA-behandelter Proben, wohingegen von den Top50 herunterregulierten Genen SA-behandelter Pflanzen etwa 86% denen von Zip1 entsprachen. [B] *Gene Ontology* Analyse mit Fokus auf „biologischer Prozess“ (BP). Gezeigt ist eine Auswahl an biologischen Prozessen, die typisch für Immunabwehrreaktionen sind. Die GOs sind entsprechend der Datenbank in englisch dargestellt. Die Heatmap verdeutlicht, dass die durch Zip1 induzierten Immunantwort-assoziierten, biologischen Prozesse in vergleichbarer Weise wie durch SA induziert sind.

Für die Analyse von SA- und Zip1-behandelten Maisblättern war es interessant in welche biologischen Prozesse die differenziell exprimierten Gene involviert sind. Somit wurde für die Analyse der GO Terminus „Biologischer Prozess“ (BP) genauer untersucht und die für Immunantwort relevanten Prozesse zusammengestellt (Abb. 14B, Anhang Abb. S4). Dabei zeigte sich, dass Gene, deren Produkte bei der Proteinbiosynthese und DNA-Synthese eine wichtige Rolle spielen, sowohl durch SA- als auch durch Zip-Behandlung reprimiert wurden (Abb. 14B; 15). Dagegen waren in Abwehrmechanismen involvierte Prozesse induziert. Dies umfasste sowohl

Abwehrreaktionen gegenüber Pilzen und Bakterien, als auch die Reaktion auf Stress und biotische Faktoren und Stimuli. Damit einhergehend wurde die Induktion von Chitinkatabolismus und Zellwandbiogenese durch Zip1- und SA-Behandlung gleichermaßen ersichtlich (Abb 14B).

Die RNAseq-Analysen bestätigten ebenfalls die qRT-PCR Daten, die die Induktion von *PR3*, *PR4*, *PR5*, *PRm6b* und *PR10* durch Zip1- und SA-Behandlung zeigten (Abb 15). Differenzielle Expression zeigte sich weder bei dem in dieser Arbeit verwendete JA-Markergen *CC9*, noch bei anderen bekannte JA-Markergenen wie *BBI* (BOWMAN BIRK INHIBITOR: EU955113) oder *serPIN* (SERIN PROTEASE INHIBITOR: GRMZM5G815098) (Christensen *et al.*, 2015; Rakwal *et al.*, 2001). Einhergehend mit der für *PR3* und *PR4* beschriebenen Chitinasefunktion zeigte sowohl nach SA- als auch Zip1-Behandlung die Induktion von sowohl Chitinase A (GRMZM2G453805) und Chitinase 1 (GRMZM2G358153), Endochitinase A (GRMZM2G051943) und Endochitinase B (GRMZM2G005633), also auch β -1,3-Glucanasen (GRMZM2G125032) und β -1,3-Glukosidasen (GRMZM2G015804), deren Induktion ebenfalls mit einer Immunantwort korreliert (Tian *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2015) (Abb 15). Ebenfalls induzierten sowohl Zip1 als auch SA Gene, die an der Zellwandbiogenese beteiligt sind (Abb 15). Dazu gehören sieben Cellulose-Synthasen (GRMZM2G018241, GRMZM2G027723, GRMZM2G424832, GRMZM2G025231, GRMZM2G112336, GRMZM2G177631, GRMZM2G111642), die die Cellulosefibrillen-Synthese katalysieren, und einige (Xyloglucan-) Glycosyltransferasen (GRMZM2G413044, GRMZM2G119783, GRMZM2G026980, GRMZM2G059825), die für die Reifung und Inkorporation von Xyloglucan in das Hemicellulose-Rückgrat der pflanzlichen Zellwand zuständig sind (Pauly *et al.*, 2013; Pauly *et al.*, 2010). Der Lipidmetabolismus war ebenfalls in vergleichbarer Weise wie die Zellwandbiogenese durch Zip1 und SA induziert (Abb. 15 zeigt repräsentative Gene)

Sowohl in Zip1- als auch SA-behandelten Pflanzen waren JA-abhängige Gene reprimiert (Abb. 15). Das beinhaltet vor allem die Lipoxygenase 8 (*LOX8*; GRMZM2G104843). Lipoxygenasen konvertieren α -Linolensäure (18:3) zu 13-Hydroperoxylinolensäure (13-HPOT). 13-HPOT dient im weiteren JA-Syntheseweg als Substrat für die Allenoxid-Synthase (AOS) und die Allenoxid-Zyklase (AOC), deren aufeinanderfolgenden katalytischen Reaktionen in der Generierung von 12-oxo-Phytodienoatsäure (12-OPDA) münden (Yan *et al.*, 2013). Diese wird über das

Enzym 12-OPDA-Reduktase (OPR) und weiteren Reaktionen zur peroxisomalen β -Oxidation überführt, bei der JA entsteht (Yan *et al.*, 2013). Interessanterweise zeigte sich in den RNAseq-Daten eine Reprimierung von *OPR6* (GRMZM2G068947) in Zip1-behandelten Proben, wohingegen keine signifikant differenzielle Expression des Gens durch SA am unter Betracht gezogenen Zeitpunkt zu verzeichnen war (Abb. 15). Ebenso zeigte sich eine signifikante Repression von *COI1* (GRMZM2G079112), einem JA-Rezeptor und dem zentralen Schlüsselregulator der JA-Signaltransduktionskaskade (Sheard *et al.*, 2010), während SA auch hier keine signifikant differenzielle Regulation von *COI1* verursachte (Abb. 15).

Des Weiteren induzierte Zip1-Behandlung die Expression zwei zentraler Gene der SA-Synthese, die Phenylalanin-Lyasen *PAL1* (GRMZM2G063917) und *PAL4* (GRMZM2G160541) (Garcion *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2012; Wildermuth *et al.*, 2001), sowie eine Shikimat Dehydrogenase (GRMZM2G314652), eine Shikimat-Kinase (GRMZM2G161566) und eine 3-Phosphoshikimat 1-Carboxyvinyltransferase (GRMZM5G877500) (Abb. 15).

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse deuten darauf hin, dass das Peptid Zip1 ein SA-analoges Immunsignal darstellt. Auf gesamttranskriptioneller Ebene zeigen sie, dass die durch Zip- und SA-induzierten Expressionsprofile zu fast 90% gleich sind (Abb. 14A).

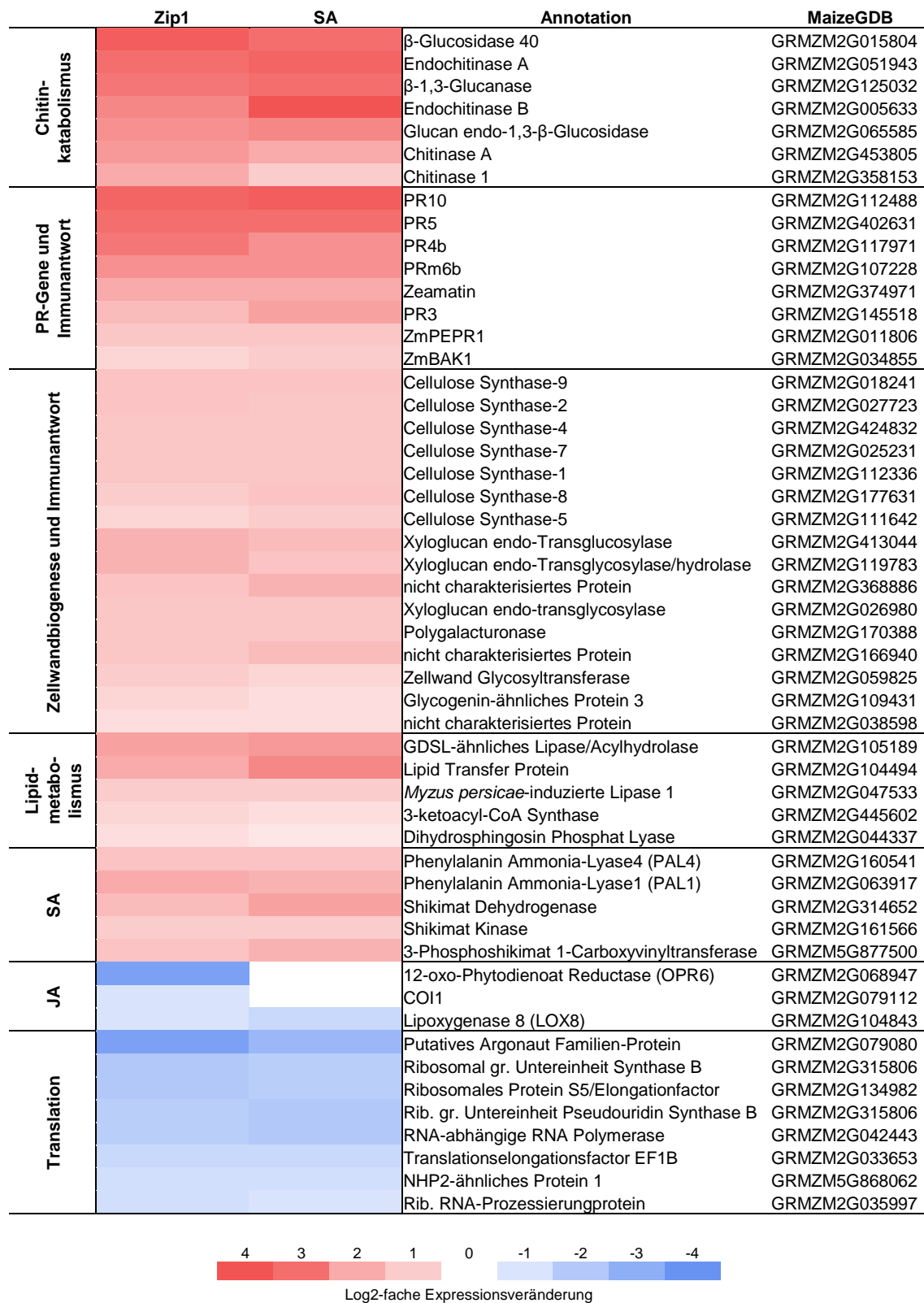


Abb. 15. Clusterheatmap einiger durch Zip1 und SA differenziell exprimierter Gene. Um die gesamttranskriptionelle Antwort von Mais auf Zip1 und SA genauer zu analysieren, wurden einzelne Gene (im Vergleich zu Mock), die an Immunantwort-assoziierten Prozessen beteiligt sind, manuell ausgewählt und anhand der LogFC-Werte der RNAseq-Analyse geclustert. LogFC-Werte wurden farblich für induzierte Gene (rot) und für reprimierte Gene (blau) in unterschiedlichen Abstufungen dargestellt (Legende). Für die Expression aller ausgewählten Gene ist ein FDR-eingestellter p-Wert von $p < 0.05$ gesetzt worden.

2.5.2 Zip1 induziert *de novo* Sythese von SA

Die in 2.5.1 beobachtete Induktion der *PAL*-Gene deutet drauf hin, dass Zip1 die Biosynthese von SA einleiten könnte und somit als Amplifikator der SA-Immunantwort fungiert. Um dies zu überprüfen, wurden Maisblätter mit 5 μ M Zip1 behandelt. In Kooperation mit Prof. Eric Schmelz und Dr. Yezhang Ding von der U.C. San Diego (Kalifornien, USA) wurde mittels HPLC/MS 24h nach der Infiltration der freie SA-Gehalt in Zip1- und Mock-behandelten Blättern sowie unbehandelten Proben bestimmt. Dabei diente Isotopen-markierte SA als interner Standard zur Bestimmung der SA-Konzentration in den Proben. Die Experimente zeigen eine signifikant höhere SA-Konzentration bei Zip1-behandelten Blättern (Abb.16A). Im Vergleich zu unbehandelten und Mock-behandelten Blättern ist eine 6-fach bzw. 5-fach höhere Konzentration von SA messbar. Unbehandelte Blätter haben eine basale SA-Konzentration von ~25 ng/g Frischgewicht (FW), wohingegen in Mock-behandelten Blättern eine leichte, aber nicht signifikant größere Menge von ~31 ng/g FW gemessen werden kann (Abb. 16A). Proben Zip1-behandelter Blätter zeigen dagegen eine Konzentration von ~150 ng/g FW (Abb. 16A). Somit bestätigen die Messungen von freiem SA die aufgrund der RNAseq-Daten aufgestellten Vermutung, dass Zip1 direkt die Biosynthese von SA induziert.

2.5.3 Zip1 erhöht die Suszeptibilität gegenüber *Botrytis cinerea*

Um die biologische Relevanz der durch Zip1 stimulierten Immunantwort zu analysieren, wurden Maisblätter mit Zip1 infiltriert und sollten anschließend mit Pathogenen infiziert werden. Da Zip1 die Synthese von SA einleitet, sollte das Wachstum nekrotropher Pathogene unterstützt und das biotropher gehemmt werden.

Basierend auf den Kenntnissen von Doehlemann *et al.* (2008), dass eine kompatible Interaktion von *U. maydis* und Mais zu JA-abhängigen Signalen führt und dies letztendlich entscheidend für die Etablierung der Biotrophie ist, lag es nahe Maiskeimlinge mit Zip1 vorzubehandeln und mit dem Brandpilz zu infizieren. Durch die Zip1-induzierten Abwehrmechanismen würde zu erwarten sein, dass eine erfolgreiche Infektion unterdrückt wird. Das bei der Inokulation durch *U. maydis* infizierte Blatt konnte nicht infiltriert werden, weil es anatomisch noch zu klein ist. Auch eine zeitnahe Nachbehandlung des infizierten, wachsenden Blattes mit Zip1

bzw. SA blieb ohne Effekt und war zudem technisch schwer realisierbar, da die jungen, fragilen Blätter durch die Infiltration zu stark beschädigt wurden. Daher wurden Infektionsversuche mit dem nekrotrophen Pathogen *Botrytis cinerea* durchgeführt. Maisblätter wurden mit 2 mM SA und 5 μ M Zip1 bzw. 5 μ M Zip1mut infiltriert und 24 h nach der Behandlung von der Pflanze abgetrennt und mit 10 μ L Sporensuspension (Titer: 1×10^6 Sporen/mL) infiziert. 4 Tage nach der Inokulation wurden die Symptome und die Ausbreitung des Grauschimmels in Form von nekrotischer Läsionsfläche quantifiziert (Abb. 16B).

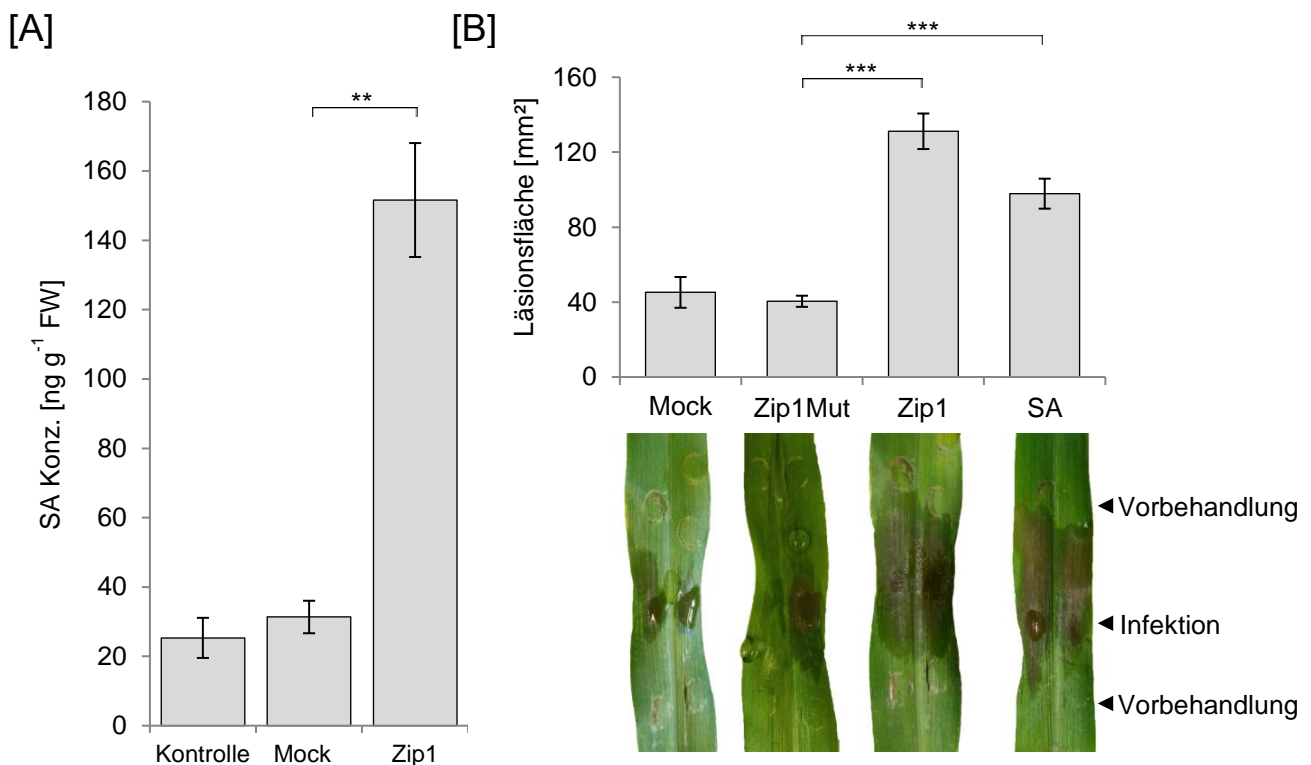


Abb. 16. Zip1 induziert die Biosynthese von SA und führt bei Mais zur erhöhten Suszeptibilität gegenüber *B. cinerea*. [A] HPLC/MS-Analyse zur Ermittlung der SA-Konzentration in unterschiedlichen Maisblattproben. Maisblätter wurden mit 5 μ M Zip1 behandelt. 24h nach der Infiltration wurde die freie SA-Konzentration der behandelten Blätter ermittelt. Dabei zeigte sich durch Zip1 eine Induktion der *de novo* Synthese von SA um das 5-fache von ca. 31 ng/g FW auf 150 ng/g FW im Vergleich zu Mock. Das Experiment zeigt das Ergebnis aus drei unabhängigen biologischen Replikaten. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts der gemessenen SA-Konzentration an. **, $p \leq 0.005$. [B] Maisblätter wurden mit 5 μ M Zip1 und 2 mM SA vorbehandelt. Nach 24 h wurden die Blätter von der Pflanze abgetrennt und mit *B. cinerea* inokuliert. Vier Tage nach der Infektion zeigte sich im Vergleich zu Zip1mut (40 mm²) bzw. Mock (38 mm²) eine signifikant höhere Infektionsrate durch *B. cinerea* auf Zip1 (137 mm²) und SA (100 mm²) vorbehandelten Pflanzen. Die Infektionsexperimente wurden in mindestens vier biologischen Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der gemessenen Läsionsfläche. ***, $p \leq 0.0005$.

Dabei zeigte sich im Vergleich zu Zip1mut und Kontrollblättern eine signifikant höhere Ausbreitung von *B. cinerea*-Läsionen auf Zip1- und SA-vorbehandelten Blättern. Die durchschnittliche Läsionsgröße auf unbehandelten Blättern lag 4 Tage nach Infektion bei 45 mm² (Zip1mut: 40 mm²). Zip1- und SA- vorbehandelte Blätter zeigten nach Infektion eine jeweils ca. 3-fach (Zip1: 131 mm²) bzw. ca. 2,5-fach (SA: 97 mm²) so große Läsionsfläche im Vergleich zu den Kontrollen. Ebenso fiel auf, dass Zip1-vorbehandelte Blätter im Vergleich zu SA-Vorbehandlung eine etwas erhöhte Suszeptibilität gegenüber *B. cinerea* aufwiesen, wobei der Effekt nicht statistisch signifikant war.

Auf Basis des Zip1 Phänotyps der Expressionsinduktion SA-assoziiierter *PR*-Gene, der RNAseq Daten und den SA-Messungen bestätigen auch die Infektionsstudien mit dem nekrotrophen Pathogen *B. cinerea*, dass Zip1 als vollständiges SA-assoziiertes Peptidsignal fungiert.

2.6 Identifizierung eines möglichen Zip1-Rezeptors

SA-assoziierte Signaltransduktionskaskaden, die durch Zip1 aktiviert werden, beruhen mit großer Wahrscheinlichkeit auf der extrazellulären Perzeption des Peptids durch einen oder mehrere Rezeptorproteine. Für die Identifizierung eines möglichen Zip1-Rezeptors wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Cyril Zipfel und Dr. Nicholas Holton (The Sainsbury Laboratory, UK) Immunopräzipitationen (IP) mit biotinyliertem Zip1 durchgeführt. Nach Behandlung von Maispflanzen und anschließender IP mittels Neutravidin Sepharose sollten mögliche Interaktoren von Zip1 via Massenspektrometrie identifiziert werden. Dazu wurden die präzipitierten Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und in vier Molekulargewichts-Fractionen via MS analysiert (Anhang Abb. S5). Nachdem die erfassten Peptide mithilfe der Mascot[®] Software (Perkins *et al.*, 1999) mit dem bekannte Maisproteom abgeglichen worden sind, konnten diejenigen Proteine herausgefiltert werden, die im Vergleich mit der Kontrolle ausschließlich in Zip1-behandelten Proben waren. Dabei wurde ein möglicher Rezeptorkandidat (GRMZM2G177570) identifiziert (Abb. 17A, Anhang Tab. S2). Im weiteren Verlauf wird dieser potenzielle, aus 1062 Aminosäuren bestehende Rezeptor als ZIPR1 (engl. ZIP1 RECEPTOR) bezeichnet. Durch BLAST-basierte Aminosäuresequenzanalysen konnten für eine membrangebundene LRR-RLK typische Domänen hervorgesagt werden (Abb. 17A). ZIPR1 besitzt zum

einen ein N-terminales Signalpeptid und eine Transmembrandomäne, die Hinweise auf eine Lokalisation in der Plasmamembran geben. Zum anderen zeigt die Aminosäuresequenz neun extrazelluläre LRRs, die zusammen mit einer C-terminalen Proteinkinasedomäne charakteristisch für eine Rezeptorkinase sind (Abb. 17A). Für weitere Experimente wurde die für ZIPR1 kodierende Sequenz (GRMZM2G177570) von cDNA der Maisvarietät Early Golden Bantam amplifiziert und als GFP-Fusionsprotein in *N. benthamiana* exprimiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation visualisiert. Eine YFP-markierte Version des *U. maydis* Effektors Pit2 wurde in Vorarbeiten als cytoplasmatisches Protein in Tabakzellen beschrieben (unpublizierte Daten, André Müller). Diese Lokalisierung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 17B). Dabei zeigten sich cytoplasmatische Stränge, die von dem Cytoplasma umgebenden Kern in die Zelle ragen und ein Indikator für cytoplasmatische Lokalisation sind (Abb. 17B, weiße Pfeile). Deshalb waren weder Zellkern noch Cytoplasmastränge in denjenigen Zellen markiert, die ZIPR1-GFP exprimierten. Stattdessen lokalisierte das Protein wie bioinformatisch vorhergesagt ausschließlich in der Plasmamembran exprimierender Zellen (Abb. 17C).

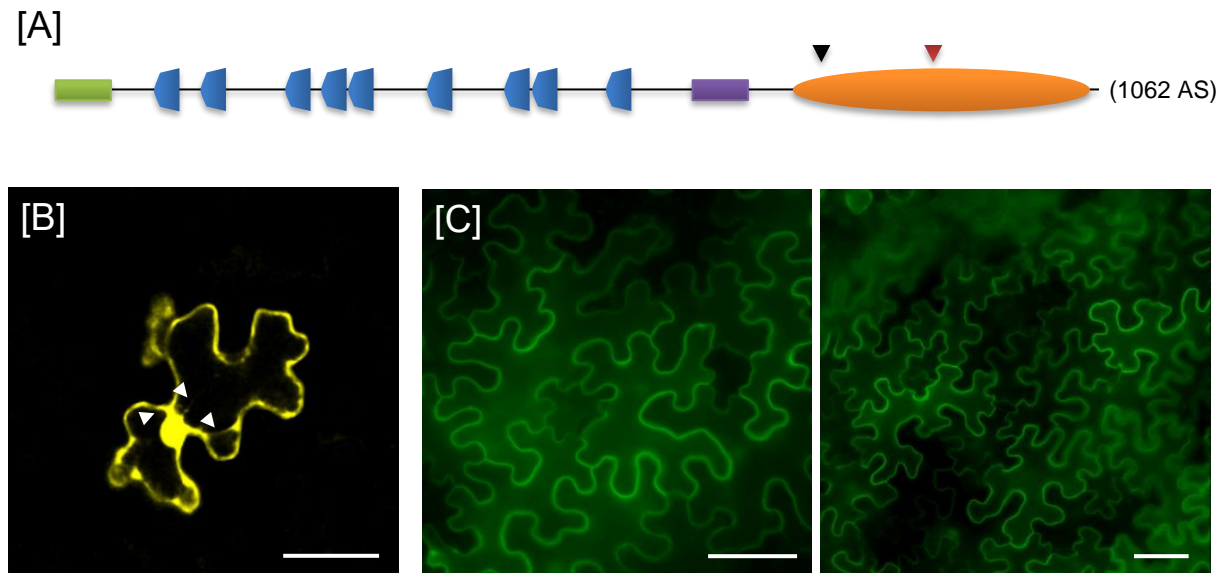


Abb. 17. Identifizierung eines potenziellen Zip1-Rezeptors, ZIPR1. [A] Durch MS konnte ein möglicher Rezeptorkandidat identifiziert werden. Schematische Darstellung der vorhergesagten Domänen von ZIPR1, die typische LRR-RLK Strukturen aufweist: Signalpeptid (grün); Leucin-reiche Regionen, LRRs (blau); Transmembrandomäne (violett); Proteinkinasedomäne (orange) mit aktivem Zentrum (roter Pfeil) und ATP-Bindestelle (schwarzer Pfeil). [B] Pit2-YFP wurde als cytoplasmatische Kontrolle verwendet. Weiße Pfeile deuten auf cytoplasmatische Stränge. [C] Der Rezeptorkandidat ZIPR1 wurde heterolog mit C-terminaler GFP-Fusion in *N. benthamiana* exprimiert, um die vorhergesagte Lokalisation in der Plasmamembran zu verifizieren.

Um das Ergebnis der IP aus Maisblättern in einem unabhängigen Experiment zu bestätigen, sollte eine Co-IP von ZIPR1-GFP mit Biotin-Zip1 durchgeführt werden. Dazu wurde der potenzielle Rezeptor wie für die Mikroskopie in *N. benthamiana* transient exprimiert und anschließend entsprechende Blätter mit biotinyliertem Peptid behandelt. Als Kontrolle wurden Pflanzen, die die Rezeptorkinase EFR mit GFP-Fusion exprimierten, mit biotinyliertem elf24 behandelt, bei denen die Interaktion bekannt ist (Zipfel *et al.*, 2006). Nach der Co-IP mit Neutravidin® Sepharose, wurde das Proteingemisch mittels α -GFP Immunoblot analysiert (Abb 18). Zur Kontrolle wurde ebenfalls der Proteininput vor der Co-IP analysiert, um sicherzustellen, dass sowohl EFR (143 kDa) als auch ZIPR1 (146 kDa) mit GFP-Fusion exprimiert werden. Beide Rezeptoren wurden in allen Experimenten exprimiert und können mit α -GFP-AK spezifisch nachgewiesen werden (Abb. 18). Für die Co-IP zeigt sich, dass Biotin-Zip1 keine unspezifische Interaktion mit EFR eingeht, wohingegen die Interaktion von Biotin-elf24 und EFR bestätigt werden konnte. Eine Interaktion von Zip1 und dem potenziellen Rezeptor ZIPR1 konnte in keiner der in dieser Arbeit durchgeführten Co-IP-Experimente gezeigt werden.

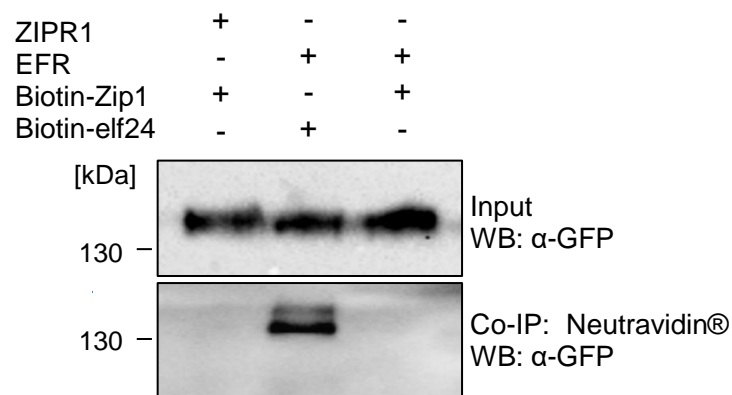


Abb. 18. Co-Immunopräzipitation von Biotin-Zip1 und ZIPR1-GFP zur Verifizierung des Rezeptors. Um die Interaktion zwischen Zip1 und dem potenziellen Rezeptor zu bestätigen, wurden Co-IPs durchgeführt. Dafür wurde ZIPR1-GFP transient in *N. benthamiana* exprimiert. Vier Tage nach Infektion mit *A. tumefaciens* wurden die Blätter mit 5 μ M biotinyliertem Zip1 behandelt. Als Positivkontrolle wurde EFR-GFP/Biotin-elf24 verwendet. Um eine unspezifische Interaktion auszuschließen, wurden EFR-exprimierende Pflanzen mit Biotin-Zip1 behandelt. Sowohl ZIPR1 (146 kDa ohne posttranslationale Glykolisierungen) als auch EFR (143 kDa ohne posttranslationale Glykolisierungen) wurden in *N. benthamiana* exprimiert und konnten mittels α -GFP Immunoblot vor der Co-IP nachgewiesen werden (Input). Nach der IP von Biotin-elf24 konnte über eine spezifische Bande für EFR die Interaktion zwischen EFR und elf24 bestätigt werden. Eine unspezifische Interaktion von Zip1 mit EFR konnte nicht beobachtet werden. Die Interaktion von Zip1 und ZIPR1 konnte jedoch ebenfalls nicht verifiziert werden. Die Co-IP wurde in acht biologischen Replikaten mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

3 Diskussion

Signalmoleküle in Form von Proteinen und Peptiden sind in tierischen Systemen schon lange bekannt. Seit der Entdeckung von Insulin und seiner Funktion als Hormon sind mittlerweile einige Proteo- und Peptidhormone bei Tieren charakterisiert worden (Banting *et al.*, 1922a; Banting *et al.*, 1922b). Aber auch Prokaryoten nutzen Peptide als Signalmoleküle, mit Hilfe derer sie beispielsweise beim sogenannten *quorum sensing* die Dichte ihrer Population regeln oder die Synthese von Antibiotika in anderen Bakterien induzieren können (Antunes *et al.*, 2010; Hibbing *et al.*, 2010).

Seit der Entdeckung von Systemin rückten im Laufe der letzten Jahrzehnte Peptide auch bei Pflanzen immer mehr in den Fokus der Forschung, da sie entscheidende Rollen sowohl in Wachstums- und Entwicklungsprozessen als auch bei der pflanzlichen Immunantwort spielen (De Coninck und De Smet, 2016; Fukuda *et al.*, 2011; Marmioli und Maestri, 2014) (vgl. Tab 1). Bis auf wenige Ausnahmen beläuft sich die Forschung aufgrund der etablierten Methodik vor allem auf die Modellorganismen *A. thaliana* und *N. benthamiana*. Die dort gewonnenen Erkenntnisse können jedoch oft auf Getreidearten und andere Nutzpflanzen übertragen werden und dienen teilweise einer wirtschaftlichen Verbesserung (Huffaker *et al.*, 2011; Lacombe *et al.*, 2010; Nekrasov *et al.*, 2017; Yamaguchi und Huffaker, 2011). Das in dieser Arbeit identifizierte Peptidhormon Zip1 ist hingegen bislang exklusiv in Mais zu finden. Die Ergebnisse dieser Arbeit über die Funktion und den Mechanismus der Aktivierung des Peptids schließen eine wichtige Lücke im Verständnis der Mais-spezifischen, SA-abhängigen Immunantwort und werden im Folgenden diskutiert.

Grundlage dieser Arbeit war die Erkenntnis, dass die Aktivierung von fünf apoplastisch lokalisierten Cysteinproteasen in Maisblättern durch SA induziert wird (Mueller *et al.*, 2013; van der Linde *et al.*, 2012a; van der Linde *et al.*, 2012b). Diese Aktivität allein reicht aus, um eine SA-assoziierte Abwehrgenexpression zu induzieren. Werden die Proteasen nach der SA-abhängigen Aktivierung durch den chemischen Inhibitor E-64 oder den endogenen Cysteinproteaseinhibitor CC9 gehemmt, kommt es nicht mehr zur Aktivierung der Immunantwort (van der Linde *et al.*, 2012a). Die Hemmung der PLCPs und die damit verbundene Unterdrückung der SA-assoziierten Abwehrreaktionen konnte als essentieller Mechanismus für die

Etablierung einer JA-abhängigen, biotrophen Interaktion zwischen *Ustilago maydis* und *Zea mays* aufgezeigt werden (Mueller *et al.*, 2013; van der Linde *et al.*, 2012a). Die Studien bestätigen, dass nicht die alleinige Anwesenheit, sondern die Aktivität der Proteasen die entscheidende Rolle spielt. Es schloss sich die Frage an, welches proteolytische Ereignis für die Aktivierung SA-assoziiierter Immunsignale im Apoplasten verantwortlich ist: (1) Werden spezifische Rezeptoren durch proteolytische Spaltung aktiviert, wie es für sogenannte PARs (engl. *protease-activated receptors*) bei der angeborenen Immunität von Tieren bekannt ist (Cirino *et al.*, 2006; Schmidlin *et al.*, 2001; Shpacovitch *et al.*, 2007)? (2) Wird durch Proteolyse eines Vorläuferproteins ein Immunsignal in Form eines Peptids freigesetzt? Aufgrund der Tatsache, dass in Pflanzen bislang noch keine PARs identifiziert worden sind, wurde der Fokus auf eine mögliche Peptidfreisetzung durch SA-aktivierte PLCPs gelegt.

3.1 Identifizierung eines Mais-spezifischen Peptidhormons

Es konnte gezeigt werden, dass Peptidfraktionen (<10kDa) SA-, nicht aber Mock-behandelter Maisblätter eine SA-assoziierte *PR*-Genexpression induzieren (vgl. Abb. 4). In den immunstimulierenden Fraktionen konnte durch massenspektrometrische Analyse das Peptid Zip1 identifiziert werden, welches in naiven Pflanzen eine SA-assoziierte Genexpression induziert (vgl. Abb. 5). Zip1 konnte nicht ausschließlich in apoplastischem Fluid SA-behandelter Pflanzen gefunden werden, sondern lag ebenfalls mit geringerem Score im Kontrollfluid vor (vgl. Anhang Tab. S1). Es ist daher anzunehmen, dass die Peptidkonzentration im Prozess der SA-abhängigen Immunantwort einen bestimmten Schwellenwert übertreten muss, damit die Zip1-abhängige Signalwirkung induziert werden kann. Die Quantifizierung des Zip1-Gehalts im apoplastischen Fluid könnte massenspektroskopisch nach stabiler Dimethylisotopen-Markierung erfolgen (Boersema *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2003). Die Methode beruht auf der Dimethylierung der primären Amine von Lysinresten aller Peptide in der Analytlösung durch Formaldehyd bzw. Cyanoborhydrid. Je nach Verwendung des Isotopomers mit schwerem Wasserstoff (Deuterium) oder ¹³C-Isotop kann das gesamte Peptidom verschiedener Analytgemische unterschiedlich schwer markiert werden. Danach würden Kontroll- und SA-Fluid zu gleichen Teilen gemischt und

mittels MS analysiert. Durch die unterschiedlich isotopische Markierung kann Zip1 beider apoplastischer Flüssigkeiten voneinander unterschieden und die relative Anwesenheit im direkten Vergleich quantifiziert werden (Boersema *et al.*, 2009). Nach den in dieser Arbeit vorliegenden Erkenntnissen wäre eine signifikant höhere Zip1-Konzentration im apoplastischen Fluid SA-behandelter Pflanzen zu erwarten, die den zu bestimmenden Schwellenwert überschreitet, um letztendlich die beobachtete Induktion von SA-abhängiger Genexpression einleiten zu können.

3.1.1 Die biologische Aktivität von Zip1 ist Sequenz-spezifisch

Sequenzanalysen von Zip1 bzw. dem Vorläuferpeptid PROZIP1 ergaben keine homologen Proteinen in anderen Pflanzenspezies. Somit konnte zumindest auf Sequenzebene ausgeschlossen werden, dass es sich bei Zip1 um ein Mitglied einer Peptidfamilie handelt, wie es beispielsweise bei AtPep1 und ZmPep1 oder bei RALF-Peptiden der Fall ist (Huffaker *et al.*, 2011; Huffaker *et al.*, 2006; Huffaker *et al.*, 2013; Huffaker und Ryan, 2007; Marmioli und Maestri, 2014; Pearce *et al.*, 2001b; Stegmann *et al.*, 2017). Aufgrund der fehlenden Sequenzhomologien wurden für weitere Untersuchungen die bioinformatisch vorhergesagten, biochemischen Eigenschaften von Zip1 näher in Betracht gezogen (vgl. Abb. 6). Dabei fiel der hydrophile N-Terminus auf, der ebenfalls bei ZmPep2 und elf18 vorliegt. Es wird angenommen, dass die hydrophilen Aminosäuren am N-Terminus von elf18 für die Bindung an den Rezeptor EFR verantwortlich sein könnten (persönliche Mitteilung von Dr. Nicholas Holton, Leaf Systems International Limited, Research Park, Norwich, UK). Durch Strukturaufklärung der bekannten Rezeptor-Komplexe von FLS-flg22 und PEPR1-Pep1 und anschließende CoIP-Experimente konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Peptid-N-Termini für die Rezeptorbindung verantwortlich sind (Sun *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015). Ersetzt man die hydrophilen Aminosäuren am N-Terminus von Zip1 durch neutrales Alanin, zeigt sich keine *PR*-Geninduktion mehr (vgl. Abb 5 und 6). Dies könnte möglicherweise auf eine ausbleibende Rezeptorbindung zurückzuführen sein. Für zukünftige Analysen sollte die Frage gestellt werden, ob wirklich alle in dieser Arbeit mutierten Aminosäuren für die Aktivität von Zip1 nötig sind. Um dies zu beantworten, sollte ein Alaninscan durchgeführt werden, bei dem jede Aminosäure von Zip1 einzeln durch Alanin ersetzt wird (Pearce *et al.*, 2008). Mit den dabei entstehenden Zip1-Varianten könnte

in Infiltrationsexperimenten herausgefunden werden, ob alle Substitutionen bei Zip1mut die Funktion beeinträchtigen oder ob einzelne bzw. weniger Aminosäuren für die biologische Aktivität des Peptids ausreichend sind. In diesem Zusammenhang sollten ebenfalls Trunkierungen des für die Funktion wichtigen N-Terminus untersucht werden (Pearce *et al.*, 2008). Ebenso sollten die Aminosäuren des Zip1-C-Terminus untersucht werden, da für flg22 und AtPep1 bekannt ist, dass ihr C-Terminus entscheidend für die Elizitor-induzierte Interaktion zwischen ihren Rezeptoren FLS2/PEPRs und dem Co-Rezeptor BAK1 ist (Sun *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015). Bei Studien zu flg22 konnte gezeigt werden, dass flg22^{Gly18}, welches in allen FLS2-aktivierenden Flagellinen konserviert ist, in der direkten Interaktion mit BAK1, nicht aber mit FLS2 steht (Sun *et al.*, 2013). Aufgrund des limitierten Platzes und einer sterischen Hinderung zeigt flg22^{G18Y}, bei dem die kleine Aminosäure Glycin zur stereochemisch größeren Tyrosin substituiert ist, keine Aktivität in der FLS2-BAK1-Komplexbildung. Hingegen ist die Interaktion mit FLS2 nicht eingeschränkt und stromabwärtsliegende Signalkaskaden sind durch die flg22^{Gly18Y}-Mutante nur geringfügig unterschiedlich beeinflusst (Sun *et al.*, 2013). Die Gly18-abhängige Interaktion mit BAK1 wird durch Wasserstoffbrückenbindungen von flg22^{Leu19} ausgehend gestärkt (Sun *et al.*, 2013). Ebenso wie bei flg22 zeigt sich am C-Terminus von Zip1 ein Glycin an Position 12, welches von Wasserstoffbrückenbindungen-ausbildendem Serin an Position 14 flankiert wird. Die Substitution dieser Aminosäure könnten bei erfolgreicher Identifizierung eines ZIPR1-Rezeptors im Vergleich zum Wildtyp-Zip1 in Co-IP- oder Chromatographie-Experimenten auf Zip1-induzierte Rezeptor-Co-Rezeptor-Komplexbildung getestet werden. Auch rezeptorunabhängig sollte in Infiltrationsexperimenten überprüft werden, ob stromabwärts liegende Signaltransduktionen wie die Induktion von *PR*-Genexpression oder die PLCP-Aktivierung von der Zip1^{G12Y}-Version beeinflusst werden.

3.2 Zip1, ein neues SA-Signal in *Zea mays*

Im Zuge der Identifizierung von Zip1 konnte gezeigt werden, dass das Peptid SA-abhängige *PR*-Genexpression induziert. Dies ist der konzeptionelle Beweis, dass es sich beim identifizierten Zip1 um ein Peptid handelt, das an der SA-abhängigen Immunantwort von Mais beteiligt ist. Bei den qRT-PCR Analysen wurden die aus der

Literatur bekannten SA-assoziierten *PR*-Gene *PR3*, *PR4*, *PR5*, *PRm6b* und *PR10* (Doehlemann *et al.*, 2008; Dolezal *et al.*, 2014; Ray *et al.*, 2016; van der Linde *et al.*, 2012a) getestet. Die bei *PR3* und *PR4* nachgewiesene Chitinaseaktivität erklärt die fungizide Wirkung der beiden Proteine (Dolezal *et al.*, 2014). Ebenso weist *PR10* fungizide Wirkung und *in vitro* Ribonukleaseaktivität auf, die in Antwort auf *Aspergillus flavus* Infektion in Maiskörnern induziert wird. (Chen *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei *PR5* und Ähnlichen um Thaumatin-ähnliche Proteine (TLPs) (Selitrennikoff, 2001; Yan *et al.*, 2015). Sie weisen signifikante Sequenzhomologie zu Thaumatin auf (Hu *et al.*, 1995). Thaumatin ist ein süß schmeckender Stoff aus dem südafrikanischen Pfeilwurzgewächs *Thaumatococcus daniellii* (van der Wel *et al.*, 1972). Das TLP Zeamatin aus Maispflanzen verursacht eine rasche Zellyse bei *Neurospora crassa* im subapikalen Bereich der Zellen (Roberts *et al.*, 1990). Außerdem inhibiert es Trypsin und α -Amylasen von Insekten (Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2001) und es konnte ebenfalls β -(1,3)-Glukanaseaktivität für TLPs nachgewiesen werden (Trudel *et al.*, 1998). Wenn auch der genaue Wirkmechanismus schwierig aus den bisher bekannten Daten zu bestimmen ist, besitzen TLPs und somit *PR*-Proteine der *PR5*-Familie fungizide Eigenschaften gegen ein weites Spektrum von Pflanzen- und Humanpathogenen (Selitrennikoff, 2001; Yan *et al.*, 2015). Die Funktion der Genprodukte aller der in dieser Arbeit untersuchten *PR*-Gene ist somit Abwehr-assoziiert und die Aktivierung erfolgt in Antwort auf Pathogeninfektion und Phytohormonperzeption. Die Induktion erfolgt in diesen Fällen exklusiv durch SA, nicht jedoch durch das antagonistisch wirkende Phytohormon JA (Anhang Abb. S6, vgl. Abb. 5). Da das qRT-PCR Expressionsprofil Zip1 behandelter Pflanzen für die oben beschriebenen *PR*-Gene dem von SA enorm ähnlich ist (vgl. Abb. 5), kann man bei dem Peptid Zip1 von einem neuen SA-Signal oder SA-analogen Peptidhormon sprechen. Die RNAseq-basierte Transkriptomanalyse bestätigt diese Beobachtungen. 89% der Top300 SA induzierten Gene sind auch durch das Peptidhormon Zip1 induziert (vgl. Abb. 14A). Neben den oben aufgeführten *PR*-Proteinen mit fungizider Wirkung zeigte die Sequenzierung die Induktion einiger Chitinasen und Glucanasen, von denen ebenfalls die Mitwirkung an der pflanzlichen Immunantwort beschrieben ist (Cordero *et al.*, 1994). Die katalytische Funktion der Hydrolyse von Chitin und β -1,3-Glucan (beide Bestandteile der pilzlichen Zellwand) dient dem Schutz der Pflanze durch direkten Angriff des Pathogens (Ray *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015).

Hinzu kommt, dass die dabei freigesetzten Chitinfragmente als PAMPs/MAMPs erkannt werden und eine Immunreaktion auslösen (Boller und Felix, 2009a; Genre *et al.*, 2013; Hayafune *et al.*, 2014; Petutschnig *et al.*, 2010).

Nebst der pilzlichen Zellwand spielt auch die Pflanzenzellwand und deren Umstrukturierung eine große Rolle bei der Immunantwort (Assaad *et al.*, 2004; Nuhse, 2012). Da die Zellwand eine der ersten physikalischen Barrieren für Pathogene darstellt, haben diese Zellwand-degradierende Enzyme entwickelt, deren Aktivität das Eintreten in die Zelle gewährleistet (Lionetti *et al.*, 2014; Malinovsky *et al.*, 2014). Pflanzen reagieren darauf einerseits mit der Produktion von Inhibitoren wie Xylanase- oder Polygalacturonaseinhibitoren, um die zellwanddegradierenden Enzyme in ihrer Aktivität zu blockieren (Belien *et al.*, 2005; Chowdhury *et al.*, 2014; Igawa *et al.*, 2005). Andererseits führt die Synthese von Callose zur Bildung von Papillen und somit zur Stärkung der Zellwand an pilzlichen Penetrationsstellen (Chowdhury *et al.*, 2014). Um jedoch bereits zerstörte Zellwandstrukturen wiederaufzubauen, ist die Synthese von Cellulose und Hemicellulose, die beide den Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand ausmachen, nötig (Endler *et al.*, 2011; Pauly *et al.*, 2013). Dies geschieht u.a. über Cellulosesynthasen und Xyloglucan-Endotransglucosylasen/Hydrolasen. Zweitere erfüllen sowohl die Funktion der Zellwandlockerung durch Hydrolyse des Xyloglucan-Rückrats während des Wachstums der Zelle als auch die der Stärkung durch Erhöhung der Xyloglucane, die für die Quervernetzung der Cellulose-Mikrofibrillen zuständig sind (Olsen *et al.*, 2016). Die RNAseq-Daten aus dieser Arbeit zeigen die Transkriptionsinduktion von sieben Cellulosesynthasen, sowie die von Xyloglucan-(Endo-) Transglucosylasen und anderer an der Zellwandbiogenese beteiligten Enzyme durch SA und Zip1 (vgl. Abb. 15). Dies geht mit der Tatsache einher, dass die Erkennung eines biotrophen Pathogens wie *U. maydis* im Zuge einer inkompatiblen Interaktion zu SA-abhängigen Abwehrreaktionen führt (Glazebrook, 2005; van der Linde *et al.*, 2012a), deren Amplifikation durch die Freisetzung von Zip1 erfolgt. Die attackierten Zellen leiten lokal SA-abhängigen Zelltod ein (Fu *et al.*, 2012). Im benachbarten Gewebe kommt es zu SAR und die dortige Induktion Zellwandbiogenese-assoziiierter Gene durch die Freisetzung von Zip1 führt zur Stärkung der Zellwand und trägt entscheidend zum Schutz der Pflanze vor neuen Penetrationsversuchen bei (Fu *et al.*, 2012)

Interessanterweise induziert Zip1 ebenfalls Gene, die direkt und indirekt an der SA-Synthese beteiligt sind (vgl. Abb. 15). Stromaufwärts der SA-Synthese sind drei

Enzyme des Shikimatwegs signifikant durch Zip1 induziert (vgl. Abb. 15). Die durch Zip1 eingeleitete Transkriptionsinduktion der Shikimat Dehydrogenase/Dehydratase, Shikimat-Kinase und der 3-Phosphoshikimat 1-Carboxyvinyltransferase katalysieren in der aufgezeigten Reihenfolge den vierten bis sechsten Schritt des Shikimatwegs (Maeda *et al.*, 2012; Wildermuth *et al.*, 2001). Der Plastid-lokalisierte Shikimatweg endet letztendlich über Shikimisäure mit der Bereitstellung von Chorismat, welches in erster Linie als Vorläufermolekül für die Synthese der proteinogen aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin dient (Maeda und Dudareva, 2012). Chorismat ist ebenfalls Ausgangsstoff für die Produktion einiger pflanzlicher Sekundärmetabolite, wie für die in Pflanzen dominierende Isochorismatsynthese (ICS)-abhängige Synthese von SA (Dempsey *et al.*, 2011). SA wird jedoch in geringerem Maßstab auch über den Phenylalanin-Lyase-abhängigen Syntheseweg produziert (Dempsey *et al.*, 2011). Dafür wird Chorismat über die Chorismatmutase zu Prephenat konvertiert, welches für die L-Phenylalanin-Synthese verwendet wird. Phenylalanin dient als Substrat für PALs und wird zu *trans*-Zimtsäure konvertiert (Bennett *et al.*, 1994; Dempsey *et al.*, 2011). Diese wiederum ist zentrales Molekül für die Produktion von SA über diesen Syntheseweg und einiger anderer für die Abwehr wichtigen Substanzen wie Lignin oder Flavonoide (Dempsey *et al.*, 2011; Vlot *et al.*, 2009). Interessanterweise wird der in Pflanzen dominante ICS-Syntheseweg durch Zip1 nicht beeinflusst, wohingegen die zunächst kontraintuitiv wirkende Transkriptionsinduktion von *PAL1* und *PAL4* zu beobachten ist (vgl. Abb. 15). In *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass sowohl die PAL-Inhibition durch den Inhibitor 2-Aminoindan-2-Phosphonsäure (AIP) als auch die Deletion der *PAL*-Gene einen messbaren, jedoch wesentlich geringeren Einfluss auf das basale SA-Level und den Pathogen-induzierten SA-Konzentrationsanstieg haben (Huang *et al.*, 2010) als *ICS*-Deletionen (Garcion *et al.*, 2008). *pal1-4*-Mutanten weisen neben einem drastisch veränderten AS-, Flavonoid- und Lignin-Metabolismus die Transkriptakkumulation der Tryptophan-Synthase und der Chorismatmutase auf, die beide Chorismat als Substrat nutzen (Rohde *et al.*, 2004). Die Hochregulation dieser beiden Enzyme in Antwort auf PAL-Inhibition/Deletion verändert demnach den Chorismatfluss und reduziert die Substratverfügbarkeit für die ICS und somit für die SA-Synthese über Isochorismat (Dempsey *et al.*, 2011). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Induktion der Shikimatweg-Enzyme (vgl. Abb. 15) erhöht die Konzentration an Chorismat in den Chloroplasten. Es deutet alles darauf hin, dass

PAL1 und *PAL4* durch Zip1 induziert werden, um zu gewährleisten, dass der Hauptanteil des erhöhten Chorismatpools für die Zip1-induzierte SA-Synthese genutzt werden kann und nicht aufgrund mangelnder PAL-Aktivität vermehrt in die Tryptophan- oder andere Metaboliten-Synthese fließt (Rohde *et al.*, 2004). Infolgedessen kommt es über den ICS- und wahrscheinlich ebenfalls vermehrt über den PAL-abhängigen Syntheseweg zur erhöhten SA-Produktion. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der PALs in *A. thaliana* für die Pathogen-induzierte Lignifizierung der Zellwand nötig ist (Mauch-Mani *et al.*, 1996). Behandelt man Pflanzen mit AIP, kommt es nicht nur zu der oben beschriebenen verminderten SA-Produktion, sondern die über die PAL Inhibition gehemmte Ligninsynthese macht die Pflanzen suszeptibel gegenüber *H. Arabidopsidis* (Mauch-Mani und Slusarenko, 1996). Entsprechend könnte die Zip1-abhängige Induktion des Shikimatwegs genauso wie der PALs zur Stärkung der Zellwand beitragen und nicht nur einen Effekt auf die SA-Synthese haben.

Die Transkriptomdaten zu den Genen, die im SA-Syntheseweg entscheidende Rollen einnehmen, konnten in dieser Arbeit auch auf metabolomischer Ebene bestätigt werden. Die Behandlung von Maisblättern mit Zip1 induziert die *de novo* Synthese von SA (vgl. Abb. 16A). Um abschließend zu prüfen, ob allein die induzierte PAL-abhängige Synthese oder auch der erhöhte Chorismatfluss über die Isochorismatmutase dafür verantwortlich ist, könnten Maispflanzen auf [1-¹³C]-D-Glucose-haltigem Medium kultiviert werden. Die so durch die Glykolyse und den Pentose-5-Phosphat-Weg für die Shikimatsynthese bereitgestellten Ausgangsprodukte [3-¹³C]-Phosphoenolpyruvate und [6,7-¹³C]-3-deoxy-D-Arabinohexulose-7-P inkorporieren je nach SA-Syntheseweg zwei (ICS-abhängig) oder drei (PAL-abhängig) ¹³C-Atome in entweder [2,6-¹³C]-SA oder [2,6,7-¹³C]-SA (Dempsey *et al.*, 2011; Mustafa *et al.*, 2009). Durch HPLC/MS Analysen des Metaboloms Kontroll- und Zip1-behandelter Pflanzen könnte so der durch den Trigger favorisierte Syntheseweg identifiziert werden (Mustafa *et al.*, 2009).

Der direkte Einfluss von Zip1 auf SA-abhängige Signaltransduktionswege wird dadurch unterstützt, dass die Zip1-Behandlung die Transkription zentraler Regulatoren, die in antagonistisch wirkenden JA-assoziierten Prozessen involviert sind, supprimiert (vgl. Abb. 15). Das F-Box Protein COI1, welches durch Zip1 transkriptionell reprimiert wird, ist mit einigen JAZ-Proteinen Teil des SKP1-SCF^{COI1}.

Komplexes. Dieser fungiert als Transkriptionsrepressor, indem die darin enthaltenen JAZ-Proteine positive JA-Transkriptionsregulatoren binden. COI1 verbindet im SCF^{COI}-Komplex die E3 Ubiquitin-Ligase mit den JAZ-Proteinen. Unter JA-Ile wird die direkte Interaktion der JAZ-Proteine mit Transkriptionsaktivatoren aufgelöst und die JA-abhängige COI1-Rekrutierung der JAZs zum SKP1-Komplex führt zum Ubiquitin-vermittelten Proteasomabbau und somit zur Aktivierung einer Vielzahl von JA-Markergenen (Pieterse *et al.*, 2012). Dieser JA-Signalweg-Schlüsselregulator wird exklusiv durch Zip1-Behandlung reprimiert (vgl. Abb. 15). Dies zeigt, dass Zip1 zusätzlich zur Induktion von SA-assoziierten Mediatoren ebenfalls antagonistische Wirkung auf JA-abhängige Signale hat.

Schließlich wird der repressive Einfluss von Zip1 auf JA-abhängige Immunantworten dadurch bestätigt, dass ein zentrales Schlüsselenzym für die JA-Synthese in Mais, die Lipoxxygenase 8 (LOX8; GRMZM2G104843) (Acosta *et al.*, 2009), durch Zip1- und SA-Behandlung supprimiert wird (vgl. Abb. 15). Lipoxxygenasen sind Nichthämeisen-enhaltende Fettsäure-Dioxygenasen, die die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren. In der JA-Biosynthese stellt speziell die plastidäre Peroxidation von α -Linolensäure zu 13-HPOT durch LOX8 den entscheidenden JA-Syntheseschritt in Mais dar (Acosta *et al.*, 2009). In der Abwesenheit von *lox8* ist in untersuchten Maispflanzen keine Lipoxxygenaseaktivität messbar und die endogene JA-Konzentration ist stark reduziert (Acosta *et al.*, 2009).

3.3 SA-aktivierte PLCPs setzen aktives Zip1 frei

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation aller potenziellen PLCP-Erkennungssequenzen dazu führt, dass PROZIP1 nicht länger proteolytisch gespalten und dadurch kein *PR*-Gen-induzierendes Zip1 mehr freigesetzt wird (vgl. Abb. 11, 12, 13). Zur abschließenden Klärung der PROZIP1-Prozessierung sollten massenspektrometrische Analysen der Peptide nach Inkubation mit Proteasen durchgeführt werden. Eine massenspektrometrische Analyse würde die Zip1-Freisetzung durch PLCPs aus PROZIP1 direkt nachweisen, wohingegen in PROZIP1^{mut^{CS}}-Ansätzen keine Prozessierung ersichtlich werden würde. Zum anderen könnten die genauen Produkte der Prozessierung von PROZIP1 identifiziert werden. Wird PROZIP1 nur, wie nach den Erkenntnissen dieser Arbeit, an den

Erkennungssequenzen durch CP1 und CP2 gespalten, würde man die *in silico* vorhergesagten Peptide zwischen den Erkennungssequenzen nachweisen können. Hier wäre ebenfalls interessant zu untersuchen, ob es innerhalb der PROZIP1-Sequenz noch weitere, biologisch aktive Peptidhormone gibt, die an der Immunantwort beteiligt sind. Bisher sind neben einiger Polyproteine aus Tieren (Herbert *et al.*, 1982) nur wenige pflanzliche Polyprotein-Propeptide bekannt (Chen *et al.*, 2008), die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Die bisher bekannten gehören zur Familie der Systemine/HypSys: Zwei Peptide, die von der Sequenz eines *N. tabacum*-Vorläufers stammen (Pearce *et al.*, 2001a), drei von einem *S. Lycopersicum*-Polyprotein (Pearce *et al.*, 2003) und vier HypSys-Peptide von einem *Petunia hybrida*-Protein (Pearce *et al.*, 2009). So könnten sich auch innerhalb der Zip1-Sequenz ein oder mehrere Peptide mit ähnlicher Funktion befinden, die nach Prozessierung mittels Massenspektrometrie identifiziert und auf ihre Aktivität zur Induktion von *PR*-Genen via qRT-PCR getestet werden können. In Ergänzung dazu könnten unterschiedliche PROZIP1-Proteaseerkennungssequenz-Varianten dabei helfen, (a) den Prozessierungsmechanismus genauer zu untersuchen und (b) das Vorhandensein anderer immunogener Peptide innerhalb der PROZIP1-Sequenz zu analysieren. Dazu sollte eine PROZIP1-Version hergestellt werden, die nur die Zip1-flankierenden Erkennungssequenzen substituiert hat (vgl. Abb. 9). Bei der Prozessierung würde Zip1 nicht freigesetzt werden. Peptidfraktionen der Prozessierungsassays hätten wie die von PROZIPmut^{CS} keinen Einfluss auf SA-assoziierte *PR*-Genexpression, es sei denn, auch andere bei der Proteolyse vom nativen PROZIP1 freigesetzten Peptide dienen als Immunamplifikator. Da bei den Proteomanalysen des apoplastischen Fluids jedoch keine PROZIP1 Peptide – außer Zip1 selbst – identifiziert worden sind, kann man vermuten, dass die Spaltprodukte nach CP1- und CP2-Prozessierung vielmehr durch Endopeptidasen verdaut werden.

Beide an der PROZIP1-Prozessierung beteiligten Proteasen sind Cysteinproteasen aus der C1A-Peptidasefamilie (Rawlings und Morton, 2008a; Rawlings *et al.*, 2008b). Bei CP2 handelt es sich um eine Aleurain-ähnliche Protease, die nur 30% Ähnlichkeit zu CP1 aufweist und bei der Samenkeimung aktiv ist (Domoto *et al.*, 1995; Rawlings und Morton, 2008a). Mueller *et al.* (2013) konnten zeigen, dass die Inhibition der Protease durch den Effektor Pit2 maßgeblich an der Etablierung der biotrophen Interaktion von *U. maydis* und Mais ist und somit eine

Mitfunktion an der pflanzlichen Immunantwort aufweist. Demgegenüber weist CP1 starke Homologien zur Protease C14 aus der Tomate und der Kartoffel auf und wird durch verschiedene *Phytophthora infestans* Effektorproteine (EPICs) inhibiert. Diese Inhibition ist für die Virulenz des Oomyceten von entscheidender Bedeutung und Genstilllegung der Protease führt zur erhöhten Suszeptibilität der Pflanze (Kaschani *et al.*, 2010). Die genaue Funktion von C14 konnte allerdings noch nicht beschrieben werden, wohingegen die Funktion von CP1 in dieser Arbeit gezeigt werden konnte: Die Virulenz von *U. maydis* ist von der Inhibition der beschriebenen Mais-PLCPs - und somit auch der von CP1 und CP2 - abhängig (Mueller *et al.*, 2013; van der Linde *et al.*, 2012a). Die durch SA aktivierten Proteasen CP1 und CP2 prozessieren PROZIP1 und setzen dabei das Peptidhormon Zip1 frei, welches die Amplifikation SA-abhängiger Abwehrmechanismen bewirkt. Aus diesem Grund stellt die Hemmung insbesondere dieser beiden Proteasen ein wichtiges Ziel bei der Etablierung einer biotrophen Interaktion dar (Mueller *et al.*, 2013; van der Linde *et al.*, 2012a).

3.4 Der pflanzliche Zip1-Rezeptor

Die durch Zip1 induzierten Signale sind zwangsläufig von einer Rezeptor-vermittelten Perzeption des Peptids abhängig, da die pflanzliche Zellmembran nicht permeabel für Peptide ist. Deshalb sollte im Zuge dieser Arbeit ein potenzieller Zip1-Rezeptor (ZIPR1) identifiziert werden. Dafür wurden Maispflanzen mit biotinyliertem Zip1 behandelt und nach anschließender Immunopräzipitation massenspektroskopisch analysiert. Im Gegensatz zu Tieren, deren Hormon- und Gefahrperzeption auf Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), transmembrane G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Toll-ähnlichen Rezeptoren beruht, sind Pflanzen auf RLKs und RLPs angewiesen, die diese Aufgaben übernehmen (Breiden *et al.*, 2016; Couto und Zipfel, 2016; Li *et al.*, 2016; Shiu *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2017). Analog zu RTKs bestehen RLKs aus einer extrazellulären Ektodomäne, einer *singlepass* Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Kinasedomäne. Die Ektodomäne von RLKs und RLPs ist hoch variabel, da sie je nach Typ eine breite Palette an Liganden wie Steroide (Wang *et al.*, 2001), Lipopolysaccharide (Ranf *et al.*, 2015), Saccharide (Miya *et al.*, 2007; Petutschnig *et al.*, 2010) oder Peptide (Chinchilla *et al.*, 2007; Zipfel *et al.*, 2006) bindet. Viele der in Pflanzen identifizierten

RLKs und RLPs spielen eine wichtige Rolle in der Pflanzenkrankheitsresistenz, doch nur wenige konnten wirklich als PRRs mit dazugehörigen Liganden bestätigt werden (Bohm *et al.*, 2014; Couto und Zipfel, 2016; Macho *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2013). PRRs können anhand ihrer Ektodomäne in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden, von denen LRR-RLKs für die Bindung von Proteinen und Peptiden zuständig sind (Tang *et al.*, 2017). Der in den CoIP-Experimenten identifizierte Rezeptor besitzt die typischen RLK Domänen, bestehend aus Ektodomäne mit neun LRRs, Transmembran- und Kinasedomäne sowie einem N-terminalen Signalpeptid. Alle anderen Kandidaten, die ausschließlich für Zip1-behandelte Proben gefunden wurden, zeigten keine typischen RLK- oder RLP-Domänen. Durch C-terminale GFP-Fusion konnte die vorhergesagte Lokalisation des Rezeptors mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie in der Zellmembran bestätigt werden (vgl. Abb. 17). Um diesen Kandidaten als Zip1-Rezeptor zu verifizieren, wurde dieser heterolog in *N. benthamiana* exprimiert und die Interaktion sollte anschließend mit biotinyliertem Zip1 via *in vivo* CoIP bestätigt werden. Dabei konnte in keiner der Experimente gezeigt werden, dass Zip1 mit dem potenziellen Rezeptor ZIPR1 interagiert (vgl. Abb. 18).

Für die Co-IP-Experimente war eine große Menge an Pflanzenmaterial notwendig. Aus diesem Grund wurden komplette Maispflanzen für die Peptidbehandlung verwendet, obwohl der Zip1-Phänotyp in dieser Arbeit nur in Blättern gezeigt wurde. Für FLS2 konnte gezeigt werden, dass die Intensität einer flg22-induzierten Immunantwort weniger vom Expressionslevel als viel mehr vom exprimierenden Gewebe abhängt (Wyrsh *et al.*, 2015). Wenn der Zip1-Rezeptor ebenfalls nur geweb- bzw. organspezifisch exprimiert wird, hat die Verwendung von ganzen Pflanzen die Rezeptorkonzentration in der CoIP soweit herunterverdünnt, dass die massenspektroskopische Identifizierung des wahren Rezeptors auf diese Art nicht möglich war. Aus diesem Grund sollten in zukünftigen Arbeiten die Experimente auf Maisblätter beschränkt wiederholt werden.

Die negativen Ergebnisse der CoIP-Experimente (vgl. Abb. 18) müssen allerdings nicht zwangsläufig bedeuten, dass es sich bei ZIPR1 um einen falschpositiven Kandidaten handelt. Obwohl es zum oben genannten Verdünnungseffekt gekommen sein könnte, sollte ebenfalls die mögliche Interaktion mit Co-Rezeptoren unter Betracht gezogen werden (Couto und Zipfel, 2016; Macho und Zipfel, 2014). Für die *A. thaliana* RLKs FLS2 und PEPR1 konnte gezeigt

werden, dass die Interaktion mit ihrem Co-Rezeptor BAK1 Elizitor-induziert verläuft (Sun *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015). Die flg22- bzw. AtPep1-Bindung führt zur Bildung eines monomeren Heterodimers zwischen Rezeptor und Co-Rezeptor, der zur Transphosphorylierung führt und entscheidend für stromabwärts liegende Signaltransduktionen ist (Schulze *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015). Weiterhin ist die RLK PSKR1 (engl. *PHYTOSULFOKINE RECEPTOR1*) für die Perzeption von Phytosulfokinen (PSKs) verantwortlich (Matsubayashi, 2014; Matsubayashi *et al.*, 1996). Diese sulfatierten Pentapeptide sind Wachstumsfaktoren, die die Proliferation von Mesophyllzellen induzieren (Matsubayashi und Sakagami, 1996). PSKR1 formt PSK-induziert ebenfalls mit BAK1 einen heterodimeren Komplex. Für diesen Komplex konnte nachgewiesen werden, dass die PSK-vermittelte Interaktion von PSKR mit BAK1 die Dissoziationskonstante (K_D) von Peptid und Rezeptor deutlich herabsetzt (Wang *et al.*, 2015). Die Zip1-induzierte Interaktion von ZIPR1 mit einem Mais-spezifischen Co-Rezeptor könnte ebenso die Peptidinteraktion mit der ZIPR1-Ektodomäne stabilisieren (Wang *et al.*, 2015). Da die Verifizierungsexperimente mit *N. benthamiana* durchgeführt wurden (vgl. Abb. 17), ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Interaktion von ZIPR1 mit seinem Co-Rezeptor aufgrund der geringen Konservierung oder gar Abwesenheit in *N. benthamiana* nicht stattfinden kann. Somit ist der K_D -Wert deutlich höher als mit Co-Rezeptor und eine Interaktion ist über CoIP aufgrund schwächerer Interaktion zwischen Zip1 und ZIPR1 nicht nachweisbar. Mit Ausnahme von CERK1 (Miya *et al.*, 2007) ist die Interaktion aller RLKs, deren Funktion in der Transduktion von Immunsignalen liegt, mit BAK1 entscheidend (Couto und Zipfel, 2016; Tang *et al.*, 2017). Daher sollte in zukünftigen Experimenten das BAK1-Homolog aus Mais (ZmBAK1; GRMZM2G384439) mit ZIPR1 co-exprimiert werden. Dies würde, falls es sich bei ZIPR1 und ZmBAK1 um das korrekte Rezeptor-Co-Rezeptor-Paar handelt, eine stärkere Interaktion von Zip1 mit dem Rezeptorkandidaten ZIPR1 gewährleisten und zum Gelingen der *in vivo* Co-IP-Experimente beitragen.

Sollte in Zukunft dennoch ein Zip1-Rezeptor durch *in vivo* CoIPs bestätigt werden können, wäre es ebenfalls sinnvoll, *in vitro* CoIPs durchzuführen (Sun *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Hierzu sollte sowohl die LRR-Ektodomäne von ZIPR1 (ZIPR1LRR) als auch eine Zip1-GST-Fusion heterolog exprimiert und aufgereinigt werden. GST-Zip1 würde für das Experiment

anschließend an Glutathion-Sepharose 4B immobilisiert werden (Sun *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Nach der Inkubation des immobilisierten Zip1 mit ZIP1LRR würde die Interaktion über anschließende SDS-PAGE und Immunoblot Analyse nachweisbar sein.

3.5 Model zur Zip1-abhängigen Immunantwort in *Zea mays*

Die Ergebnisse zur Untersuchung der durch Zip1 amplifizierten SA-abhängigen Immunantwort, mit der Erkenntnis der Freisetzung des Peptidhormons durch SA-aktivierte PLCPs, lassen sich in einem Modell zusammenfassen (Abb. 18):

Für die Gewährleistung einer kompatiblen Interaktion zwischen Mais und *U. maydis* sekretiert der Basidiomycet Effektorproteine, die SA-assoziierte Immunreaktionen zugunsten des Pilzes modulieren und supprimieren (Doehlemann *et al.*, 2013; Doehlemann *et al.*, 2008). Dabei werden auf bisher unbekannte Weise JA-abhängige Signalwege induziert und die SA-abhängige Immunantwort entsprechend der antagonistischen Wirkung von SA und JA herunterreguliert (Doehlemann *et al.*, 2008). Die Suppression SA-abhängiger Immunität wird unter anderem durch den Effektor Cmu1 gewährleistet (Djamei *et al.*, 2012; Djamei *et al.*, 2011). Cmu1 kodiert für eine in die Pflanzenzelle translozierte Chorismatmutase, die die enzymatische Umsetzung von Chorismat zu Prephenat katalysiert (Djamei *et al.*, 2011). Der Effektor agiert im Cytosol der Pflanzenzelle zusammen mit der Mais-Chorismatmutase ZmCm2. Auf diese Weise wird ein erhöhter Ausstrom von Chorismat aus den Plastiden begünstigt. Letztendlich wird so die plastidäre SA-Synthese durch den Konzentrationsabfall von verfügbarem Substrat gehemmt (Djamei *et al.*, 2011).

Durch *U. maydis* eingeleitete JA-Signale resultieren unter anderem in der transkriptionellen Aktivierung von CC9. CC9 wird in den Apoplasten sekretiert und hemmt dort fünf durch SA aktivierte PLCPs (van der Linde *et al.*, 2012a). Analog dazu sekretiert *U. maydis* den Effektor Pit2, der ebenfalls die beiden PLCPs CP1 und CP2 inhibiert (Mueller *et al.*, 2013). Auf diese Weise wird die SA-assoziierte Immunantwort durch Inhibition der Proteaseaktivität unterdrückt, was zur Etablierung einer JA-abhängigen, kompatiblen Interaktion beiträgt (Doehlemann *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2013; van der Linde *et al.*, 2012a). Kommt es demgegenüber jedoch im Zuge einer inkompatiblen Interaktion zur überwiegenden SA-Reaktion, wird die

Sekretion und Aktivierung der beschriebenen PLCPs CP1, CP2, XCP2 und CatB eingeleitet (van der Linde *et al.*, 2012a). Die Aktivierung von Zip1 ist auf die Aktivität der beiden Proteasen CP1 und CP2 angewiesen. Diese treffen nach Aktivierung auf das ebenfalls im Apoplasten befindliche PROZIP1 und katalysieren die proteolytische Freisetzung von Zip1.

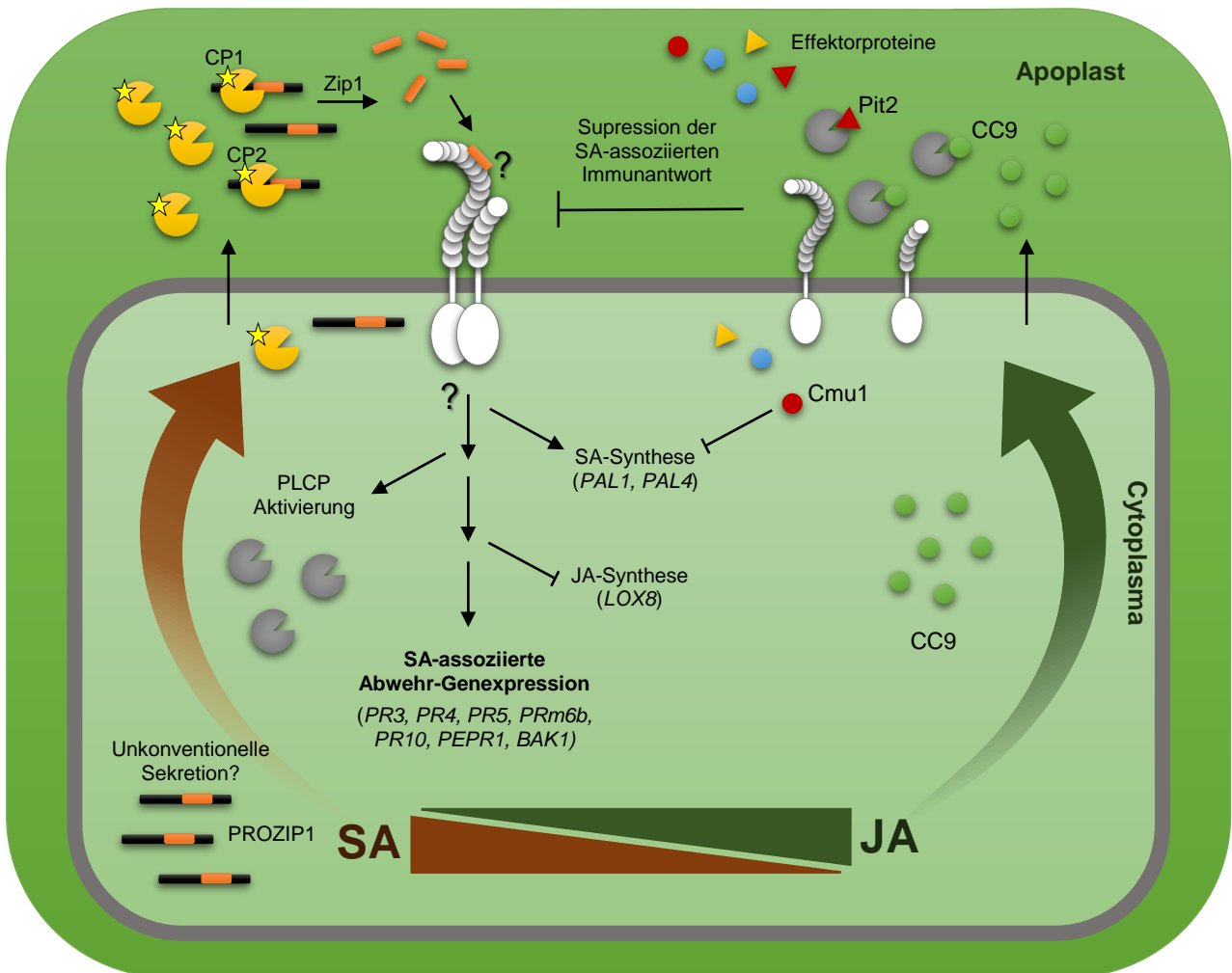


Abb. 18.: Modell zur Zip1-abhängigen Immunantwort von *Zea mays*. Detaillierte Erklärungen sind dem Text zu entnehmen. SA = salicylic acid; JA; jasmonic acid; PLCP = papain-like cysteine protease; CP1/CP2 = Cysteinprotease1/2; Zip1 = *Zea mays* immune signaling peptide 1; Pit2 = protein involved in tumors 2; CC9 = CORN CYSTATIN 9; Cmu1 = Chorismatmutase 1; PAL1/4 = Phenylalaninlyase 1/4; LOX8 = Lipoxygenase 8; PR = pathogenesis-related; PEPR1 = PEP1 RECEPTOR 1; BAK1 = BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1.

Die Perzeption von Zip1 durch einen bisher nicht identifizierten Rezeptor führt zur Umprogrammierung der Zelle und letztendlich zur Amplifikation der SA-assoziierten Immunantwort. Dabei kommt es durch Zip1 zur *de novo* Synthese von SA, die mit der transkriptionellen Induktion einiger Enzyme des Shikimatwegs und von PAL1

und *PAL4* einhergeht (Dempsey *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2010; Rohde *et al.*, 2004). Ebenso reprimiert Zip1 die Transkription von *OPR1* und *LOX3*, die beide an der JA-Synthese beteiligt sind (Schaller *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2013). Neben der Initiation der Expression SA-abhängiger Markergene wie *PR3*, *PR4*, *PR5*, *PRm6b* oder *PR10* reguliert Zip1 interessanterweise die Induktion der *A. thaliana*-homologen RLKs *PEPR1* und *BAK1*, für die beide eine zentrale Mitwirkung an einer Peptidelizitor-induzierten Immunantwort gezeigt wurde (Couto und Zipfel, 2016; Greeff *et al.*, 2012; Krol *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2015; Yamaguchi *et al.*, 2010). Zusammen mit der durch Zip1 eingeleiteten Aktivierung von Abwehr-assoziierten PLCPs stimmen Zip1- und SA-abhängige Immunreaktionen nahezu überein. Die Zip1-assoziierten Reaktionen liegen stromabwärts der PLCP-Aktivierung durch SA und somit auch stromabwärts der Initiation einer SA-Immunantwort. Daher kann bei dem Peptidhormon Zip1 ähnlich wie bei den ZmPeps (Huffaker und Ryan, 2007; Krol *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2010) von einem Amplifikator der Mais-spezifischen, SA-assoziierten Immunantwort gesprochen werden.

3.6 Ausblick

In Bezug auf die Lokalisation und den Prozessierungsort von PROZIP1 sollten in zukünftigen Arbeiten zwei Szenarien überprüft werden, die die PROZIP1-Sekretion in den Apoplasten sicherstellen könnten. Zum einen könnte eine passive Freisetzung des Propeptids durch lokalen, SA-induzierten Zelltod und der damit einhergehenden Zelllyse möglich sein (Fu *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2012). Diese Theorie würde bekräftigen, dass die Zip1-Amplifikation der SA-assoziierten Immunantwort stromabwärts der SA-Signalkaskade liegt. Zum anderen ist aufgrund eines fehlenden Signalpeptids (SP) eine unkonventionelle Sekretion wahrscheinlich. Durch SecretomeP-Analyse (Bendtsen *et al.*, 2004; Bendtsen *et al.*, 2005) konnte PROZIP1 einer nicht-klassischen und SP-freien Sekretion zugeordnet werden (Anhang Abb. S7). Beide aufgezeigten Szenarien bringen PROZIP1 und die PLCPs CP1 und CP2 im Apoplasten zusammen, wo es zur proteolytischen Freisetzung von Zip1 kommt. Die unkonventionelle Sekretion von PROZIP1 scheint auf Basis der Tatsache, dass fast 50% des pflanzlichen Sekretoms SP-unabhängig freigesetzt wird, der wahrscheinlichere Mechanismus zu sein, der durch die SA-induzierte Zelllyse passiv verstärkt werden könnte (Agrawal *et al.*, 2010).

Darüber hinaus konnten BLASTp-Analysen von Zip1 und PROZIP1 keine Sequenz-homologen Proteine in der Familie der Süßgräser oder anderen Pflanzenspezies identifizieren. Dennoch liegt eine PROZIP1-Gendublikation (GRMZM2G140153; PROZIP2) auf Chromosom 8 des Maisgenoms vor. Darin unterscheidet sich die Zip1-Aminosäuresequenz nur in einer Substitution von Zip1Ala¹⁰⁰ zu Zip2Val¹⁰⁰ und ist damit eine konservative Mutation (Anhang Abb. S8), die keinen Einfluss auf die biochemische Eigenschaften des Peptids hat (Simon French *et al.*, 1993). Die Anwesenheit einer exprimierten Genkopie auf einem anderen Chromosom unterstützt die in dieser Arbeit erforschte funktionelle Bedeutung von Zip1.

Da die SA-abhängige Immunantwort im Reich der Pflanzen ein hochkonservierter Mechanismus ist, ist es ebenfalls wahrscheinlich, dass die Amplifikation der Immunantwort nicht nur bei Mais Peptid-abhängig verläuft. Somit ist ebenfalls denkbar, dass die Funktion von Zip1 als SA-assoziiertes Peptidhormon auch in anderen Süßgräsern oder Pflanzenfamilien vorkommt. Sequenz-homologe Systemine konnten beispielsweise nur in einer Unterfamilie der *Solanaceae* nachgewiesen werden (Pearce *et al.*, 2009; Pearce *et al.*, 2001a). Dennoch reagieren andere Nachtschattengewächse auf Verwundung ebenfalls mit der systemischen Produktion von Proteaseinhibitoren (Ryan *et al.*, 2002). Aufgrund dieser konservierten, jedoch Aminosäuresequenz-unabhängigen Funktion wurden die dafür verantwortlichen Peptidhormone als Hydroxyprolin-reiche Glykopeptid-Systemine (HypSys) bezeichnet (Irving und Gehring, 2012; Pearce *et al.*, 2009). Daher ist anzunehmen, dass auch für Zip1 funktionsähnliche, nicht aber Sequenz-homologe Peptide in der Familie der Süßgräser vorliegen, die als Peptidhormone an der konservierten SA-abhängigen Immunantwort beteiligt sind.

Mit der Identifizierung von Zip1 ist das erste Peptidhormon klassifiziert worden, das im Gegensatz zu Systemin/HypSys oder zu dem JA-induzierten Peptid ZmPep1 an der SA-abhängigen Immunantwort beteiligt ist. Somit füllen die Daten dieser Arbeit nicht nur eine Lücke im Verständnis zur SA-assoziierten, PLCP-abhängigen Immunantwort von Mais, sondern werfen auch die Frage auf, ob SA- und JA-abhängige Signaltransduktionen auf Peptidebene miteinander verschaltet sind. Ist somit der *Crosstalk* von SA und JA im Gegensatz zu dem von PTI und Brassinosteroid-abhängigen Wachstumsprozessen (Lozano-Duran *et al.*, 2013; Lozano-Duran und Zipfel, 2015) nicht stromabwärts, sondern bereits durch die

entsprechende Perzeption und feinabgestimmte Rezeptorinteraktion bestimmt? Ein validierter Zip1-Rezeptor könnte für zukünftige Arbeiten diese Frage beantworten. Ebenso würden CRISPR-Cas9 generierte Mais *Knock-out*-Mutanten weitere Studien zur Zip1-abhängigen Immunantwort erlauben. Da davon auszugehen ist, dass die Funktion von Zip1 ähnlich wie die der ZmPeps redundant in Mais ist und ebenfalls eine PROZIP1-Kopie auf Chromosom 8 vorliegt, wären CRISPR-Cas9 generierte Deletionsmutanten des Rezeptors hilfreicher als *prozip1*-Maislinien (Svitashev *et al.*, 2016). Mit der Identifizierung und Charakterisierung der Peptid-vermittelten Zip1-abhängigen SA-Immunantwort in Mais eröffnet sich die Möglichkeit der Untersuchung des *Crosstalks* zwischen SA- und JA-Transduktionssignalwegen unter Zuhilfenahme von JA-assoziierten ZmPeps und ZmPEPR1. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten in Zukunft als molekulare Werkzeuge genutzt werden und einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung krankheitsresistenter Nutzpflanzen leisten.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von *p. a.* Qualität und wurden von den Firmen Biozym (Hessisch Oldenburg), Difco (Augsburg), GE Healthcare (München), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Invitrogen (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Thermo Fisher Scientific (Dreieich) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

4.1.2 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Ausubel und Sambrook hergestellt (Ausubel *et al.*, 2002; Sambrook *et al.*, 1989). Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt. Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden, soweit nicht anders beschrieben, vor Verwendung für 5 min bei 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Filteraufsatzes (Porengröße 0,2 µm; Merck) sterilfiltriert.

4.1.3 Enzyme und Antikörper

Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen. Als DNA-Polymerasen wurden Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes), *PfuUltra*™ High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene), Taq DNA-Polymerase (Fermentas) und KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (Novagen®/Merck) verwendet. Die Ligation spezifischer DNA Moleküle wurde mit der T4 DNA Ligase von NEB durchgeführt. Enzymatischer DNA Abbau wurde mit dem TURBO DNA-free Kit (Ambion®/Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden von den Firmen Cell Signaling Technology, Thermo Fisher und Sigma-Aldrich bezogen.

4.1.4 Verwendete Kits und sonstiges Material

In dieser Arbeit wurden folgende Kits verwendet: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und zur Aufreinigung von PCR Produkten und Plasmiden; QIAprep® Spinprep Kit (Qiagen)

zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA. Zusätzlich verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

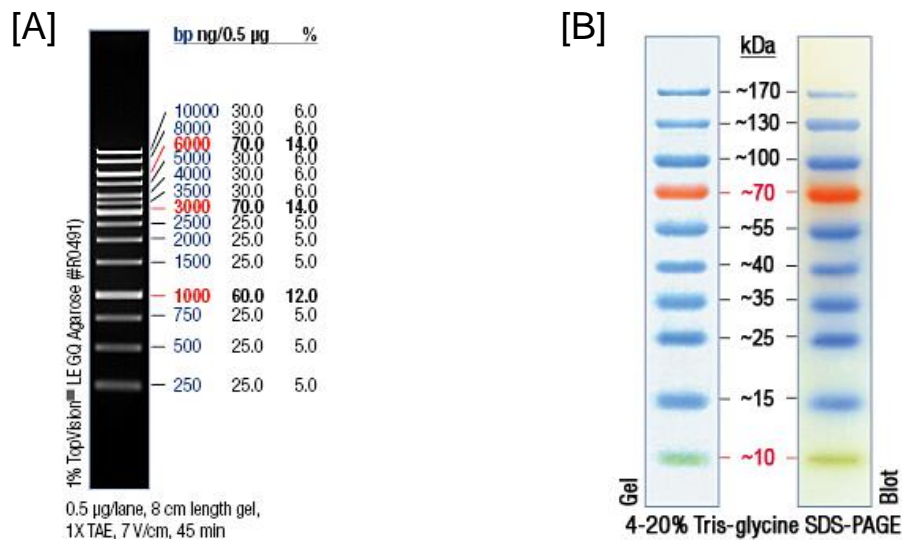


Abb. 19. In dieser Arbeit verwendete Größenmarker. [A] 1kb-DNA-Ladder von Fermentas. [B] PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa) von Thermo Scientific.

4.2 Zellkultivierung

4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli Stämme wurden in dYT-Medium nach Sambrook (1989) bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Antibiotikazugaben erfolgten nach den in Tabelle 3 angegebenen Konzentrationen. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 50% (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

dYT-Flüssigmedium (Sambrook, 1989)

1,6 % (w/v) Trypton-Pepton
1,0 % (w/v) Yeast Extract
0,5 % (w/v) NaCl
in dH₂O, autoklaviert

YT- Festmedium

0,8 % (w/v) Trypton- Pepton
0,5 % (w/v) Yeast Extract
0,5 % (w/v) NaCl
1,3 % (w/v) Agar
in dH₂O, autoklaviert

4.2.2 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

tumefaciens Stämme wurden in dYT-Medium nach Sambrook (1989) bei 28°C und 200 Upm kultiviert. Antibiotikazugaben erfolgten nach den in Tabelle 3 angegebenen Konzentrationen. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 50% (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

Tab. 3. Für die Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens* eingesetzte Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration [µg/mL]
<i>Ampicillin (Amp)</i>	100
<i>Carbenicillin (Carb)</i>	100
<i>Rifampicin (Rif)</i>	40
<i>Streptomycin (Strep)</i>	100
<i>Kanamycin (Kan)</i>	40
<i>Genatmycin (Gent)</i>	50

4.2.3 Kultivierung von *Botrytis cinerea*

Für die Kultivierung von *B. cinerea* wurden Dauerkultursporen des Stammes B05.10 auf Malzextraktplatten (33.6 g/L Difco™ *Malt Extract Agar*) ausgestrichen und 7 Tage bei RT auskeimen gelassen, bis die gesamte Platte mit Pilzmyzel bedeckt war. Um die Sporulation zu initiieren, wurden die Platten 16 h unter eine Schwarzlichlampe gestellt und anschließend 2-3 Tage im Dunklen inkubiert. So konnten die Sporen mit Medium nach Gamborg abgewaschen werden und die Sporenzahl für eine Infektion unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer auf 1×10^6 Sporen/mL eingestellt werden.

Gamborg Medium	0,3% (w/v)	Gamborg B5 Mineralsalz-Mix (GB5Basal Salt Mixture; Duchefa)
	10 mM	KH ₂ PO ₄
	25 mM	Glukose
	pH 5,5 einstellen, sterilfiltrieren	

4.2.4 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde in einem Novaspecll Gerät (Pharmacia Biotech/GE Lifesciences, München) bei 600 nm (OD_{600nm}) photometrisch bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen wurden Kulturen durch entsprechende Verdünnungen auf Werte unter 0,8 verdünnt. Als Referenzwert wurde das

entsprechende Kulturmedium verwendet. Bei *E. coli* und *A. tumefaciens* entspricht eine OD_{600nm} von 1 Wert etwa 1×10^9 Bakterienzellen.

4.3 Stämme, Vektoren, Oligonukleotide und Peptide

4.3.1 Escherichia coli

Tab. 4. Verwendete E.coli-Stämme

Stamm [Genotyp]	Verwendung	Referenz
<u>K-12 DH5α</u> [F– Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1]	Plasmidamplifizierung/Klonierung	(Grant et al, 1990 /Gibco/BRL, Eggenstein)
<u>BL21(DE3)pLysS</u> [F–, ompT, hsdSB (rB–, mB–), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr	Heterologe Herstellung von Proteinen	Novagen/Merck, (Darmstadt)

4.3.2 Agrobacterium tumefaciens

Zur transienten Expression von Proteinen in *Nicotiana benthamiana* wurde *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 (Koncz et al., 1986) verwendet, der eine chromosomale Rif-Resistenz besitzt. Außerdem enthält dieser Stamm das TiPlasmid pMP90, das die für den DNA-Transfer nötigen *vir*-Gene, jedoch eine ansonsten nicht funktionelle T-DNA-Region enthält und Gent-Resistenz vermittelt. Außerdem enthält der verwendete Stamm eine auf dem Ti-Helferplasmid lokalisierte Tet-Resistenz. Durch dieses wird in *trans* die Replikation der Plasmide in *A. tumefaciens* vermittelt.

4.3.3 Botrytis cinerea

Für Infektionsexperimente mit Mais wurde in dieser Arbeit der haploide *B. cinerea* Stamm B05.10 verwendet. Er wurde freundlicherweise von Matthias Hahn (Universität Kaiserslautern) bereitgestellt.

4.3.4 Plasmide

pRSET-GST-PP (Schreiner *et al.*, 2008)

Dieses Plasmid basiert auf einem von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) unter dem Namen pRSET vertriebenen Plasmid. Dieses wurde dahingegen modifiziert, dass der Hexahistidin-*tag* durch einen GST (Glutathion-S-Transferase)-*tag* ersetzt wurde. Am 3'-Ende des *gst*-Gens befindet sich eine Region, die für eine PreScission-Protease- Erkennungssequenz kodiert, was es ermöglicht, den GST-*tag* zu entfernen. Dieses Plasmid diente als Ausgangsplasmid zur Herstellung verschiedener PROZIP1-Varianten. Dieses Plasmid vermittelt Amp-Resistenz.

pRSET-GST-PP-HA-PROZIP1

Dieses Plasmid wurde zur Produktion von PROZIP1 in *E. coli* generiert. Es enthält AC210027.3_FGP003 , das mit den Primern OZ64 und OZ77 amplifiziert und über *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor kloniert wurde.

pRSET-GST-PP-HA-PROZIP1Mut^{CS}

Dieses Plasmid wurde zur Produktion von PROZIP1 in *E. coli* generiert. Es enthält AC210027.3_FGP003 , welches durch die Firma Genscript Biotech Corporation synthetisiert wurde und die potenziellen Proteaseschnittstellen mutiert hat. Es wurde über *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor kloniert.

pGreenII0029

Ausgangsplasmid für transiente Expression von Genen in *N. benthamiana*. Dieses Plasmid basiert auf pGreen0000 (Hellens *et al.*, 2000) und vermittelt Kan-Resistenz.

pGreen-CP2 (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, das zur transienten Expression von *cp2* in *N. benthamiana* verwendet wurde. Es enthält NP_001105479, welches durch die Primer OCFH94 und Oma41 amplifiziert und über *Xba*I und *Sac*I in pGreenII0029 kloniert wurde.

pGreen-CP1A (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, das zur transienten Expression von *cp1a* in *N. benthamiana* verwendet wurde. Es enthält NP_001148706, welches durch die Primer OCFH90 und Oma45 amplifiziert und über *Xba*I und *Sac*I in pGreenII0029 kloniert wurde.

pGreen-XCP2 (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, das zur transienten Expression von *cp1a* in *N. benthamiana* verwendet wurde. Es enthält NP_001149806, welches durch die Primer OCFH92 und Oma54 amplifiziert und über *Xba*I und *Sac*I in pGreenII0029 kloniert wurde.

pGreen-CatB (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, das zur transienten Expression von *cp1a* in *N. benthamiana* verwendet wurde. Es enthält NP_001150152, welches durch die Primer OCFH92 und Oma54 amplifiziert und über *Xba*I und *Sac*I in pGreenII0029 kloniert wurde.

pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen)

Der pENTR™/D-TOPO® wurde zur direktionalen Klonierung von *blunt end* PCR-Produkten zur Verabreichung in Gateway® oder MultiSite Gateway® Systeme verwendet. Die PCR-Produkte können in diesem System ohne vorherige Restriktion und anschließende Ligation kloniert werden. pENTR™/D-TOPO® Vektor umfasst M13- und T7-Primer-Sequenzierungsstellen und attL-Rekombinationsstellen um die PCR-Produkt-Insertionsstelle. Die Klone können deshalb problemlos in beliebige Gateway®-Destination-attR-Vektoren sequenzverifiziert und rekombiniert werden. Ein Kanamycin-Resistenz-Gen und ein pUC-Ursprung dienen der Selektion und hohen Kopiepropagation in *E. coli*.

pENTR™/D-TOPO®-ZIPR1 (diese Arbeit)

Das Plasmid wurde generiert, um den potenziellen Zip1-Rezeptor ZIPR1 über die *attachment sites* und mithilfe der kommerziell erhältlichen LR Clonase® in das Gateway System einzuschleusen.

pEARLEYGATE 103 (Invitrogen)

Die pflanzenkompatiblen pEARLEYGATE Gateway®-Zielvektoren sind Derivate des Vektors pFGC5941, dessen Grundlage der bekannte pCAMBIA ist (www.cambia.org) (Earley *et al.*, 2006). Der in dieser Arbeit verwendete pEARLEYGATE-103 vermittelt Kan-Resistenz und ist durch einen *high-copy-number-ori* in *E. coli* amplifizierbar. Außerdem können nur *ccdB*-resistente Bakterien mit dem Leervektor transformiert werden. Erst durch erfolgreiche Rekombination über die in pENTR™/D-TOPO® enthaltenen *attachment sites* wird er für *ccdB*-sensitive Stämme amplifizierbar. Das PCR-Produkt des *gene-of-interests* wird durch Rekombination in den Zielvektor C-terminal mit eGFP-6xHis-Tag verknüpft und die Transkription über einen CaMV 35S Promoter gesteuert. Für stabile Transformation von Pflanzen ist die Selektion über BASTA-Resistenz realisierbar.

pEARLEYGATE103_ZIPR1-eGFP-6xHis (diese Arbeit)

Das Plasmid wurde generiert, um Lokalisationstudien mit dem potenziellen ZIPR1-Rezeptor durchzuführen. Ebenso diente die C-terminale GFP-Fusion zur Detektion von ZIPR1-eGFP bei Co-IP Experimenten.

pEARLEYGATE103_EFR-eGFP-6xHis (Nicholas Holton, Cyril Zipfel)

Das Plasmid wurde von Dr. Nicholas Holton (TSL Norwich) zur Verfügung gestellt und diente als Positivkontrolle in Co-IP Experimenten.

Tab. 5. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung/Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
PROZIP1-XbaI_fw	GCTCTAGAATGGTCAAGCGCCTAGGGA GCCG	Amplifizierung von PROZIP1 und Einführen einer 5'-XbaI Restriktionsschnittstelle
PROZIP1-BamHI_rv	ATGGATCCAAAATCCAGCCGACGCTCG C	Amplifizierung von PROZIP1 und Einführen einer 3'-BamHI Restriktionsschnittstelle
PROZIP1-BamHI_fw	TAGGATCCATGGTCAAGCGCCTAGGGA GCCG	Amplifizierung von PROZIP1 und Einführen einer 5'-BamHI Restriktionsschnittstelle
PROZIP1-XhoI_rv	TACTCGAGTCAAAAATCCAGCCGACGC	Amplifizierung von

		PROZIP1 und Einführen einer 3'-XhoI Restriktionsschnittstelle
PROZIP1-BamHI-HA_fw	TCGGATCCATGTACCCATACGATGTTCC AGATTACGCTGTCAAGCGCCTAGGGAG CCG	Amplifizierung von PROZIP1 und Einführen einer 5'-BamHI Restriktionsschnittstelle und eines HA-tags
ZIPR1-fw	ATGCAGTCACTGAATTGGCT	Amplifizierung des putativen Zip1 Rezeptors ZIPR1
ZIPR1-rev	ATCCCCAGCTGCACTTGACACCT	Amplifizierung des putativen Zip1 Rezeptors
ZIPR1-CACC_fw	CACCATGCAGTCACTGAATTGGCTA	Amplifizierung des putativen Zip1 Rezeptors Amplifizierung des putativen Zip1 Rezeptors ZIPR1 und Einführung eines CACC-Überhangs für pENTR-D/TOPO Gateway-Klonierung
ZIPR1-rv_w/o-stop	CAGCTGCACTTGACACCTGCTG	Amplifizierung des putativen Zip1 Rezeptors ZIPR1 und Entfernung des Stop-Codons für Proteinfusionen
ZIPR1-seq1	CCTATCTGGTCCTCTGCAAG	Sequenzierungsprimer für ZIPR1
ZIPR1-seq2	TGAACAAATTCAATGGAAC	Sequenzierungsprimer für ZIPR1
ZIPR1-seq3	TTTGTGGCCTTCAAGATATC	Sequenzierungsprimer für ZIPR1
GAPDH qPCR_fw	CTTCGGCATTGTTGAGGGTTTG	qRT-PCR Primer
GAPDH qPCR	TCCTTGGCTGAGGGTCCGTC	qRT-PCR Primer
PR3 qPCR_fw	GAACAACCTACAGCAGCCAGGTG	qRT-PCR Primer
PR3 qPCR_rv	GAGACAATAGCTGACATGCGTC	qRT-PCR Primer
PR4 qPCR_fw	GCGTTCAAGCCCATCGACA	qRT-PCR Primer
PR4 qPCR_rv	CGTGTGGGATCACATCCATATAAC	qRT-PCR Primer
PR5 qPCR_fw	TATCGGCCGGAATAGGCTCTG	qRT-PCR Primer
PR5 qPCR_rv	CGCGTACATACAAATGCGTGTC	qRT-PCR Primer
PRm6b qPCR_fw	CATCTTCGCCATGTTCAACG	qRT-PCR Primer
PRm6b qPCR_rv	ATTTGTCCGGGTTGAAGAGG	qRT-PCR Primer
PR10 qPCR_fw	CAAGCTCATCGCAGACCAC	qRT-PCR Primer
PR10 qPCR_rv	CGATCTCAACAGTCCAGCTGTT	qRT-PCR Primer
CC9 qPCR_fw	TATGGGTCCTTGACGTTCTC	qRT-PCR Primer
CC9 qPCR_rv	GGATCATCCGTAGCCATCTG	qRT-PCR Primer

Tab. 6. In dieser Arbeit verwendete Peptide

Name	Sequenz
Zip1	+EGESELKLATQGASVRR ⁻
Zip1mut	+AGASALALATQGASVRR ⁻
Ac-Zip1	Ac ⁻ +EGESELKLATQGASVRR ⁻
Biotin-Zip1	Biotin ⁻ +EGESELKLATQGASVRR ⁻
Ac-elf24-biotin	Ac ⁻ +SKEKFERTKPHVNVGTIGHVDHGK ⁻
flg22	Biotin ⁻
	+QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA ⁻

4.4 Molekularbiologische Standardmethoden

4.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA-Präparation wurde mit Puffern der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Dazu wurden 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Pellets in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und durch vortexen gemischt. Zur Zell-Lyse wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben, die Proben durch mehrfaches invertieren gemischt und für 1-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Proteine zu fällen und die Lösung zu neutralisieren, wurden 300 µl Puffer P3 hinzupipettiert, durch invertieren gemischt und für 10 min bei 13.000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße, in welchen 700 µl Isopropanol zur DNA-Fällung vorgelegt wurde, überführt. Die Mischung wurde invertiert und zur Fällung der DNA für 20 min bei -20°C oder kurz auf RT inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 13.000*g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet mit 600 µl 70% Ethanol gewaschen, für 10 min bei 13.000 zentrifugiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurde das DNA-Pellet kurz getrocknet und in 50 µl H₂O_{bid.} resuspendiert. Plasmid-DNA, die später für Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde nach der Plasmidpreparation zusätzlich mit dem Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

4.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Maisblättern

Für die Isolierung von RNA aus Maisblättern wurde das behandelte Gewebe in flüssigem N₂ eingefroren und unter ständiger Zugabe von N₂ mit Mörser und Pistill zu Puder homogenisiert. Es wurden ca. 300-400 µL des gemörserten Blattmaterials verwendet und nach direkter Zugabe von 1 mL TRIzol® Reagenz (Invitrogen) in

einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gut durchmischt. Dem Gemisch wurden 200 µL Chloroform zugefügt. Nach erneutem vortexen wurde die Probe bei 15,000*g für 20 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß übertragen und mit 1 mL kaltem EtOH gemischt. Zur Präzipitation der RNA wurde erneut bei 15,000*g für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und nach einem Waschschriff mit 70% EtOH das Pellet mit 30 µL RNase-freiem Wasser für 10 min bei 55°C gelöst.

4.4.3 *In vitro* Modifikationen von Nukleinsäuren

4.4.3.1 Restriktion

Restriktionen von DNA wurden mittels Typ II-Restriktionsendonukleasen (NEB) für 1-12 h bei Enzym-spezifischer Temperatur durchgeführt. Die verdaut DNA wurde später auf Agarosegelen analysiert. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 – 2 µg reine DNA
2 µl enzymespezifischer 10 x NEB-Puffer 1-4
2 µl 10x BSA
0,5 U Restriktionsendonuklease
ad 20 µl mit H₂O_{bid.}

4.4.3.2 Dephosphorylierung linearer DNA

Eine Dephosphorylierung kam zum Einsatz, wenn z.B. eine *blunt-end*-Ligation erwünscht war. Hierbei wurde jeweils die 5' - Phosphatgruppe der endständigen Nukleotide abgespalten. Verwendet wurde die alkalische Phosphatase (Roche) oder die antarktische Phosphatase (NEB). Die Dauer und Temperatur der Inkubation waren vom verwendeten Enzym abhängig. Ein typischer Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

20 µl Restriktionsansatz
10 µl Dephosphorylierungspuffer
25 U alkalische / antarktische Phosphatase
ad 20 µl mit dH₂O

4.4.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase (NEB) eingesetzt. In Ligationen, bei denen ein linearisierter Vektor mit einem Insert verbunden werden

sollte, wurde die entsprechende DNA im äquimolaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Bei *blunt-end* Ligationen wurde 1:10 des Endvolumens PEG-8000 eingesetzt. Die Ligationen wurden für mindestens eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Ein typischer Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

n mol Vektor
3 x n mol Insert-DNA
2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer
ggf. 2 µL PEG-8000
200 U T4-DNA-Ligase, *ad* 20 µl mit dH₂O

4.4.3.4 Gateway®-Klonierung über pENTR-D-/TOPO Vektoren

Die Gateway®-Klonierungen erfolgten mit dem pENTR™/D-TOPO™ *Cloning Kit* und dem Gateway™ LR Clonase™ II Enzym Mix der Firma ThermoFisher Scientific. Alle Reaktionen wurden strikt nach Herstellerangaben und nach mitgelieferten Protokollen durchgeführt.

4.4.3.5 Ortspezifische Mutagenese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuremutagenesen zum gezielten Austausch von einzelnen oder wenigen Basen in Plasmiden mittels PCR mit bis zu drei Primern, die die gewünschten Mutationen enthielten, wurden mit dem QuikChange (Multi) Kit (Agilent) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.4.4 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Mittels Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der verwendeten Gele variierte je nach aufzutrennender Fragmentgröße zwischen 0,8% und 2,0%. Zur Herstellung der Gele wurde die jeweilige Menge an Agarose in 1x TAE aufkochen gelöst und anschließend (nach abkühlen auf ca. 60°C) mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,2 µg/ml) versetzt. Das Gel wurde in flüssigem Zustand in eine Gelform gegossen. Nach Erhärten des Gels wurde dies in eine dafür vorgesehene Kammer transferiert und mit Puffer bedeckt. Das Gel wurde auf der Seite der Kathode mit DNA oder RNA in nicht denaturierendem Gelauftragspuffer beladen und bei ca. 10 V/cm einem elektrischen Feld ausgesetzt. Hierbei wanderte die DNA als poly-Anion langsam (in Abhängigkeit von Größe und Agarosekonzentration) in Richtung Anode. Sichtbar gemacht wurde die DNA durch UV-Bestrahlung bei 254

nm. Die Dokumentation fand mit der Geldokumentationsanlage (BioDoc-IT-System, UVP) statt.

50x TAE-Puffer	2 M	Tris-Base
	2 M	Essigsäure
	50 mM	EDTA, pH 8,0
6x Gelauftragspuffer (nicht-denaturierend)	50% (v/v)	Sucrose
	0,1% (v/v)	Bromphenolblau
	mit Wasser ansetzen und sterilfiltrieren	

4.4.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren (z. B. PCR- oder Restriktionsansätze) wurden mit dem Kit „Wizard SV Gel and PCR Purification System“ (Promega, Mannheim) aus Agarosegelfragmenten nach Herstellerangaben eluiert bzw. aufgereinigt.

4.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktionen wurden zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet. Je nach Anwendung wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Diese sind mit den entsprechenden typischen Ansätzen im Folgenden beschrieben. Dazu werden die im Ansatz enthaltenden Komponenten angegeben. Außerdem wird das PCR Programm, vereinfacht nach folgendem Schema dargestellt: Initiale Denaturierung/Dauer – [Denaturierung – Anlagerung – Elongation] x Zahl der Zyklen – finale Elongation dargestellt. Die Elongationszeiten wurden je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments und nach Synthesegeschwindigkeit des verwendeten Enzyms variiert. Die Anlagerungstemperaturen wurden *in silico* mittels des Programms Clonemanager 9 (Sci-Ed Software, Cary/USA) bestimmt. Die PCR-Reaktionen wurden in der PCR-Maschine TProfessional Standard Gradient Thermocycler (BioMetra) durchgeführt.

4.4.7 PCR-Ansatz mit Phusion-Polymerase

Ansatz: ca. 50 µg Matrizen-DNA
200 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)
1 µM Primer 1 (bindet am 5' Strang)
1 µM Primer 2 (bindet am 3' Strang)
1 x konzentrierter GC-Puffer (Finnzymes)
0,5 U Phusion-Polymerase

Programm: 98°C/30 s – [98°C/30 s – 55-74°C/10 s – 72°C/10s/kb] x 30-40 – 72°C/10 min

4.4.8 PCR-Ansatz mit GoTaq® Green Master Mix

Ansatz: 1 x konzentrierter GoTaq® Green Mix
1 µM Primer 1 (bindet am 5' Strang)
1 µM Primer 2 (bindet am 3' Strang)
0,5 µl Zellkultur bzw. 1 Kolonie (Pilze oder Bakterien)

Programm: 94°C/2 min – [94°C/30 s – 50-65°C/20 s – 72°C/30 s/kb] x 30-40 – 72°C/10 min

4.4.9 PCR-Ansatz mit KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase

Ansatz: 0.5 µl KOD Xtreme™ HotStart DNA Polymerase
1 x konzentrierter KOD Xtreme™ Puffer
1 µM Primer 1 (bindet am 5' Strang)
1 µM Primer 2 (bindet am 3' Strang)
100 ng Template DNA

Programm: 94°C/2 min – [94°C/30 s – 50-65°C/20 s – 72°C/30 s/kb] x 30-40 – 72°C/10 min

4.4.10 cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese für qRT-PCR wurde mittels des „Superskript III First Strand Synthesis SuperMix“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.4.11 Quantitative *real-time* PCR

Für die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) wurde RNA aus infiziertem Maisgewebe extrahiert. DNA-Reste in den RNA-Proben wurden mittels des „Turbo DNA-free“ Kits (Ambion/Applied Biosystems) entfernt und 0,3-2 µg RNA mittels des „Superskript III First Strand Synthesis SuperMix“ in cDNA revers transkribiert (Thermo Scientific). Die cDNA wurde für qRT-PCR Reaktionen eingesetzt, die mit Hilfe des „iQ™ SYBR® Green Supermix“-Kits (BioRad) nach Herstellerangaben durchgeführt wurden. Die Reaktionen wurden in einem iCycler-System (BioRad) unter der Verwendung des folgenden Programmes durchgeführt: 95°C/2 min – [95°C/30 s – 61°C/30 s – 72°C/30 s] x 45. Die Spezifität der Reaktionen wurde anhand der vom Gerät berechneten Schmelzkurve überprüft. Der „Threshold Cycle“

wurde mittels der Bio-Rad Software Version 3.0 ermittelt. Die relative Expression wurde manuell in Excel berechnet (Pfaffl *et al.*, 2002).

4.4.12 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Alle Sequenzierreaktionen wurden extern von dem Sequenzier-Service der Firma GATC Biotech (Köln) durchgeführt und beruhen auf der Kettenabbruch-Methode nach (Sanger *et al.*, 1977).

4.5 RNAseq

Die für die Sequenzierung benötigten cDNA *libraries* wurden mit dem Illumina TruSeq® RNA *stranded samples preparation* Kit hergestellt. Die Präparation startete mit 1 µg totaler RNA. Nach Poly-A-Anreicherung über magnetische *beads* mit gebundenen poly-T-Oligos, wurde die RNA mit divalenten Kationen und erhöhter Temperatur fragmentiert. Die so erhaltenen RNA Fragmente wurden mithilfe von *random* Oligos einer reversen Transkription unterzogen, dem sich eine Zweitstrang cDNA Synthese mit DNA Polymerase I und RNase H anschloss. Die cDNA wurde anschließend nach *end repair* und Polyadenylierung (Poly-A-Schwanz) mit Index Adapttern für die Sequenzierung ligiert. Um die endgültige *library* zu erstellen, wurde die cDNA aufgereinigt und mittels PCR (14 Zyklen, 10 µl template) amplifiziert. Mit der Agilent Tape Station wurde diese einem Qualitätscheck unterzogen, sodass im Anschluss äquimolare Mengen gepoolt werden konnten. Mithilfe des „Peglab KAPA *Library Quantification*“ Kits und des 7900HT Sequence Detection Systems der Firma Applied Biosystems konnte die *library* quantifiziert und anschließend mit einem Illumina HiSeq4000 Sequenzierer mit *paired-end* (2x75 Zyklen) Protokoll sequenziert werden.

4.6 Mikrobiologische Standardmethoden

4.6.1 Rubidium-Chlorid-vermittelte Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach S.N. Cohen (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm

inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000*g und 4°C pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000*g, 4°C), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 60 sec bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYTMedium versetzt und 30-60 min bei 800 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Der Transformations-Ansatz wurde auf selektiven dYT-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

RF1-Lösung

100 mM	RbCl
50 mM	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
30 mM	K-Acetat
10 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
15% (v/v)	Glyzerin
in H ₂ O _{bid.} , pH 5,8 (Acetat), sterilfiltriert	

RF2-Lösung

10 mM	MOPS
10 mM	RbCl
75 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
15%	(v/v) Glyzerin
in H ₂ O _{bid.} , pH 5,8 (NaOH), sterilfiltriert	

4.6.2 Kalzium-Chlorid-vermittelte Transformation von *A. tumefaciens*

Die Herstellung und Transformation von *A. tumefaciens* erfolgte nach einem Protokoll von J. L. Flowers L. J. Vaillancourt und (Flowers *et al.*, 2005), wobei anstelle des dort aufgeführten LB-Flüssigmediums dYT-Flüssigmedium verwendet wurde.

4.7 Biochemische Methoden

4.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) handelt es sich um eine denaturierende, diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese. Mit dieser Methode werden denaturierte Proteine nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt, um Molekülgröße und Reinheit zu bestimmen oder um Proteingemische aufzutrennen. Zum vollständigen Denaturieren wird die Proteinlösung 5 min bei 99°C mit 1 x SDS-Gelladepuffer und DTT (100 mM) erhitzt. So können sich die negativ geladenen SDS-Moleküle an die Proteine anlagern und verleihen diesen eine der Molekülmasse proportionale Ladung. Es wurden vertikale Gele (10,5 x 11,5 x 1 cm) verwendet (Mini Protean System, BioRad). Diese setzen sich aus Sammel- und Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Probe in einer Ebene vor dem Eintritt in das Trenngel, wobei die unterschiedliche Mobilität der Proteine in einem pH-Gradienten ausgenutzt wird. Dem Sammelgel werden Taschen zugefügt, in die die denaturierte Probe eingefüllt werden kann. Im Trenngel werden die Proteine in der Probe durch ein Polyacrylamidnetz nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt, wobei größere Proteine langsamer durch das Gel wandern als kleinere. Das Molekularnetz ist bei höherprozentigen Gelen enger, so dass hiermit kleinere Proteine aufgetrennt werden können. Für die Auftrennung größerer Proteine werden Gele mit geringeren Acryl-/Bis-Acrylamidanteilen benutzt. Als Laufpuffer in der Gelkammer diene SDS-Laufpuffer. Die Molekülmasse der aufgetragenen Proteine wurde durch ein vorgefärbtes Proteinstandardgemisch (Prestained Protein Marker 10-170 kDa, Thermo Scientific) bestimmt. Die angelegte Spannung betrug 300 V während die Stromstärke von 90-150 mA variierte. Die Proteine wandern aufgrund der durch die Anlagerung von SDS negativen Ladung vom Minus- zum Pluspol.

6 x SDS-Gelladepuffer	1,5 mM Tris-HCl pH 6,8 30% (w/v) SDS 0,15% (w/v) Bromphenolblau 10% Endkonzentration Glycerin
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 4 mM SDS

Sammelgel	5% (v/v) Acrylamid 0,1% (w/v) SDS in 125mM Tris-HCl, pH 6,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05% (v/v) Tetramethylethyldiamin (TEMED)
------------------	--

Trenngel	12-17% (v/v) Acrylamid 0,1% (w/v) SDS in 375mM Tris-HCl, pH 8,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05% (v/v) TEMED
-----------------	---

4.7.2 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Westernblot)

Im Westernblot wurden Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, auf eine PVDF-Membran übertragen und dort durch Immundetektion spezifisch detektiert. Für den Transfer der Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran wurde ein Semi-DryBlot FastBlot durchgeführt.

Für den Blot wird eine Lage 3 mm Whatman-Papier in Transfer-Puffer befeuchtet und mit der PVDF-Membran bedeckt. Auf die Membran wird blasenfrei das SDS-Gel gelegt und mit einem weiteren feuchten 3 mm Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer wurde für 10 min bei 25 mA/Gel durchgeführt (Transfer-Blot® Turbo™, Biorad)

Western-Transfer-Puffer	25 mM	Tris-HCl, pH 10,4
	192 mM	Glycin
	15% (v/v)	Methanol/Ethanol

Die durch Western-Blotting auf PVDF-Membranen überführten Proteine wurden durch spezifische Antikörper detektiert. Dazu wurde die Membran mit Blockierlösung für mindestens eine Stunde inkubiert, kurz mit TBS-T gewaschen und dann für 1-12 h bei 4°C oder RT mit Antikörperlösung, die den primären Antikörper enthielt, geschwenkt. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit Antikörperlösung, welche den sekundären Antikörper enthielt, für eine Stunde bei RT inkubiert. In dieser Arbeit wurden ausnahmslos Meerrettich-Peroxidase- (HRP; „*horse raddish peroxidase*“) Konjugate als sekundäre Antikörper verwendet. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T

wurde die Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt, indem die Membran für fünf Minuten mit ECL Reagenz (GE Healthcare) inkubiert wurde. Das Lichtsignal der in eine Folie überführten Membranen wurden mithilfe einer Chemilumineszenz Kamera (ChemiDoc™MP, Biorad) detektiert und je nach Intensität 1-15 Min exponiert.

TBS-T	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween20
Blockierlösung	3-5% (w/v) Milchpulver in TBS-T
Antikörperlösung	Antikörper nach Herstellerangaben in TBS-T verdünnt (siehe Tabelle 6)

4.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung löslicher Proteine in Proteinextrakten und Fraktionen gereinigten Proteins wurden mit Hilfe der Methode von M. M. Bradford durchgeführt. Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet (Bradford, 1976).

Tab. 7. In dieser Arbeit verwendete Antikörper und HRP-Konjugate

Antikörper	Verwendung	Verdünnung	Bezugsquelle
α -HA	monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von HA-Fusionsproteinen diente	1:10.000	Sigma-Aldrich
α -GFP	monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von HA-Fusionsproteinen diente	1:5000	Cell Signaling
α -Maus-HRP	Sekundärer Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern die aus Mäusen gewonnen wurden	1:2.500	Cell Signaling
Streptavidin-HRP	Konjugat aus kovalent gebundenem Streptavidin und Horseradish-Peroxidase zur Detektion von Biotin	1:3.000	Sigma-Aldrich
α -Phospho p44/p42	Polyklonaler Antikörper zur spezifischen Detektion phosphorylierter MAPKs	1:1000	Cell Signaling

4.7.4 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Für die Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden in dieser Arbeit BL21(DE3)pLysS Zellen verwendet. Entsprechende Informationen zum transformierten Stamm und den Expressionsbedingungen sind in Tabelle 8 aufgezeigt. Der jeweilige Stamm wurde zunächst in einer Vorkultur in dYT Flüssigmedium + Antibiotika angesetzt und über Nacht bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Vorkultur wurde daraufhin 1:100 in 3 L dYT + Antibiotika verdünnt auf 1 l Erlenmeyerkolben verteilt. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37°C und 200 Upm. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wurde die Induktion der T7-RNA-Polymerase unter Zugabe von IPTG eingeleitet. Allen Zielproteinen ist in diesem Expressionssystem ein T7 Promoter vorgeschaltet, der die spezifische, T7 Polymerase-abhängige Proteinproduktion gewährleistet. Nach den in Tabelle X aufgeführten Inkubationszeiten wurden die Zelle bei 4°C und 6000*g für 30 Min geerntet und anschließend bei -20°C gelagert.

Tab. 8. In dieser Arbeit transformierte *E. coli* Stämme zur heterologen Herstellung rekombinanter Proteine.

Stamm	Plasmid	IPTG [mM]	Inkubationszeit [h]	Inkubations-Temperatur [°C]
BL21(DE3)pLysS	pRSET-GST-PP-HA-PROZIP1	1	16-20	16
BL21(DE3)pLysS	pRSET-GST-PP-HA-PROZIP1 ^{mutCS}	2	16-20	16

4.7.5 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die N-terminale Fusion eines Glutathion-S-Transferase (GST)-tags ermöglicht eine Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathionsepharose und erhöht gleichzeitig die Löslichkeit des daran fusionierten Proteins. Um die GST Fusion vom Zielprotein zu entfernen, befindet sich zwischen ihnen eine sogenannte PreScission® Protease Schnittstelle. Dabei handelt es sich um eine für die kommerziell erwerbliche PreScission® Protease (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) spezifische Erkennungssequenz bestehend aus den Aminosäuren LeuGluValLeuPheGln/GlyPro. Ein GST-tag an der PreScission® Protease selbst gewährleistet die Bindung an Glutathionsepharose, sodass sich am Ende lediglich das vom GST-tag abgeschnittene Protein im Durchfluss befindet. Zur Zellyse

wurden entsprechende bei -20°C gelagerte Zellpellets auf Eis aufgetaut, in 20ml GST-Lyse-Puffer resuspendiert und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension fünf Mal für 30 s auf Eis sonifiziert. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (30 min bei 4°C und 45.000*g) entfernt. Parallel wurde eine Gravitationsdurchflusssäule mit 1ml Glutathion-Sepharose 4B (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) beladen und diese mit 10ml TBS-Puffer äquilibriert. Der Überstand des zentrifugierten Lysats wurde auf die Säule gegeben und für 1h bei 4°C auf einem Drehschüttler inkubiert. Danach wurde die Säule geöffnet und der Durchfluss mit ungebundenen Proteinen verworfen. Es folgten drei Waschschriffe mit jeweils 10ml TBS-Puffer und ein Waschschriff mit 10ml PreScission®-Prozessierungspuffer. Anschließend erfolgte die spezifische Entfernung des GST-tags mithilfe der PreScission® Protease (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden). Hierfür wurden 160 U PreScission® Protease in 2ml PreScission®-Prozessierungspuffer auf die Säule gegeben und diese für 16h bei 4°C stehend inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Säule geöffnet und der Durchfluss, der Proteine ohne GST-tag enthielt, aufgefangen. Verbleibende Proteine wurden durch zweimaliges Waschen mit je 2ml PreScission®-cleavage-Puffer ausgespült. Sämtliche Durchflussfraktionen von vier Säulen wurden vereinigt und mittels Amicon Ultra-4 Säulen (Millipore/Merck, Darmstadt, Germany) mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa zu einem Endvolumen von ca. 6ml nach Herstellerangaben konzentriert. Die resultierende Proteinlösung wurde anschließend steril filtriert, auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad® 16/600 Superdex 75 pg, GE Healthcare), die zuvor mit PROZIP1-Lagerungspuffer äquilibriert wurde, geladen und bei einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Jene, die reines Protein enthielten, wurden vereinigt und erneut mithilfe von Amicon Ultra-4 Säulen (Millipore/Merck, Darmstadt, Germany) mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa bis zu einem Volumen von etwa 500-800µl konzentriert. Die entsprechende Proteinkonzentration wurde anschließend mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976) bestimmt. Zur Kurzzeitlagerung wurden entsprechende Proteinlösungen bei 4°C gelagert, zur Langzeitlagerung wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 40% (v/v) zugegeben und bei -80°C gelagert.

GST-Lyse-Puffer	50 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 1% (v/v) Triton X-100
TBS-Puffer	50 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl
PreScission®-Prozessierungspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1mM DTT
PROZIP1-Lagerungspuffer	150 mM Tris-HCl, pH 8.5 300 mM NaCl

4.7.6 (Co-) Immunopräzipitation mit Biotin-Zip1

Für IP Experimente zur Identifizierung möglicher Peptid-Rezeptorkandidaten wurden etwa 10g Maispflanzen in 5 mm große Stücke geschnitten. Diese wurden mit Peptid- oder Kontrolllösung versetzt und unter 9 mbar Vakuum infiltriert. Möglichst komplett gefüllte Pflanzenstücke wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter ständiger Kühlung mithilfe von Pistill und Mörser zu feinem Puder verarbeitet. Pro Gramm Pflanzenmaterial wurden mL Extraktionspuffer zur 30-minütigen Proteinextraktion verwendet. Unlösliche Bestandteile wurden bei für 15 min abzentrifugiert. Das Proteinextrakt wurde mit 50 µl equilibrierter Neutravidin Agarose (Thermo Scientific) versetzt und bei für 2-3 h inkubiert. Anschließend konnten die *beads* bei 700 Upm pelletiert werden. Der Überstand wurde entfernt und die Agarose 4x mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Nachdem die gewaschenen *beads* in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurden, konnte die Elution der Proteine mit Proteinladepuffer + DTT bei 99°C erfolgen. Für die Identifizierung eines Rezeptors wurde das IP Proteom auf SDS-Gelen (4-12% Bis-Tris Plus, Invitrogen) aufgetrennt und zur massenspektrometrischen Analyse gegeben.

Zur Verifizierung eines möglichen Rezeptorkandidaten wurden CoIP Experimente mit *N. benthamiana* durchgeführt. Dafür wurde das Kandidatengen mit einer GFP-Fusion transient über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation in *N. benthamiana* exprimiert. 3 Tage nach Infiltration wurden die Blätter geerntet. Die CoIP erfolgte wie bei Maispflanzen mit dem Unterschied, dass die Proben mittels α-GFP Westernblot analysiert wurden.

Anmerkung: Die Neutravidin Agarose hat eine Kapazität von 8 mg/ml, d.h. 50 µl binden 400 µg Peptid.

Extraktionspuffer	20 mM Tris pH 7.2 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 1% IGEPAL 1 Proteaseinhibitor-Tablette
--------------------------	---

Waschpuffer	20 mM Tris pH 7.2 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 0,5% IGEPAL
--------------------	---

4.7.7 Aktivitäts-basierte Markierung von PLCPs

Zur Analyse der Aktivität von heterolog überexprimierten Papain-ähnlichen Cysteinproteasen in apoplastischem Fluid aus *N. benthamiana* oder nativen PLCPs aus Mais wurde die Sonde MV202 bzw. DCG-04 verwendet (Greenbaum *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2015). Diese sind biotinylierte Derivate des Cysteinprotease-Inhibitors E-64 und binden kovalent am Cystein des aktiven Zentrums von Cysteinproteasen. Über einen biotinylierten Rest (DCG-04) oder einen fluoreszierenden BODIPY Farbstoff (MV202) können markierte Cysteinproteasen mittels Western Blot oder In-Gel-Visualisierung detektiert werden. Der Proteingehalt im Assay wurde mit jeweiligem Puffer auf 200 µg/ml eingestellt. Das Assayvolumen betrug 500 µl. Zur Kontrolle der Cysteinproteasespezifität wurden Proben mit E-64 15 Min vorinkubiert. Anschließend wurden DCG-04/MV202 in einer Konzentration von 0.2 µM zugeben und für 0,5-3 h bei RT auf einem Drehinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe eiskalten Acetons üN bei -20°C gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 13.000*g und 4°C pelletiert. Das Proteinpellet wurde anschließend mit 80 % Aceton gewaschen und erneut für 5 min bei 13.000*g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 50µl Probenpuffer mit 100 mM DTT resuspendiert und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden standardmäßig in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot auf eine PVDF oder Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blockierung der Membran erfolgte in entfettetem TBS-BSA für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran für 1-3 h mit dem Streptavidin-Peroxidase

Konjugat inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte mittels des ECL Plus Western Biodetection Reagent (GE Healthcare) (siehe auch 4.5.2). Für die Visualisierung von MV202 Markierungen wurde ein Fluoreszenzscan des SDS-Gels durchgeführt (ChemiDoc™MP, Biorad).

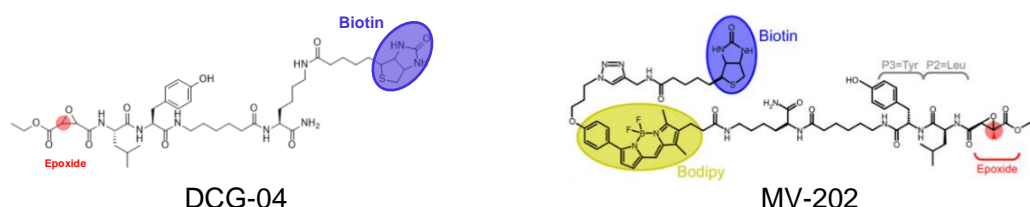


Abb. 20. Strukturformel der in dieser Arbeit verwendeten Sonden zur Markierung von aktiven PLCPs.

4.7.8 Protease-Aktivitätstest

PLCP Aktivität wurde gemessen, indem fluorimetrische Messungen unter Verwendung der fluoreszierenden Substrate Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-AMC), Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-Arg-Arg-AMC), Boc-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC) und N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) durchgeführt wurden. Diese Substrate können spezifisch von Proteasen gespalten werden, wobei es zur Freisetzung einer fluoreszierenden Gruppe kommt, deren Fluoreszenz bei 460nm detektiert werden kann (Zimmerman *et al.*, 1976). Zur Bestimmung der Cysteinprotease-Aktivität wurde apoplastisches Fluid von Maisblättern oder Tabakpflanzen verwendet. Hierzu wurden 10µl der zu untersuchenden Probe für 10 min mit 80 µl Protease-Assaypuffer inkubiert, welcher wahlweise auch E-64 enthalten konnte. Anschließend wurde durch Zugabe von 10µl einer 100µM Substrat-Stammlösung die Fluoreszenzreaktion gestartet, welche dann in einem Fluorimeter (Tecan Safire, Crailsheim) über einen Zeitraum von 10 min gemessen wurde.

Protease-Assaypuffer

10mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,0
150mM NaCl
1mM EDTA
0,5mM DTT

4.7.9 Prozessierungsassays

Für die *in-vitro* Prozessierungsassays von PROZIP1 wurde apoplastisches Fluid aus SA behandelten Pflanzen isoliert und die Induktion der Proteaseaktivität mittels ABPP ermittelt (siehe 4.5.6 und 4.6.4). Für ein Assay wurden 70 µl AF mit 1 mM DTT und wenn nötig 5 µM E-64 10 min vorinkubiert. Anschließend wurden 5 µM PROZIP1 hinzugeben und das Assay Volumen mit H₂O_{DTT} auf 100 µl aufgefüllt. Zu gewünschten Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 100% Acteon gestoppt. Die Fällung erfolgte bei -20°C über Nacht. Durch Zentrifugation mit 17.000*g wurden die gefällten Proteine pelletiert und anschließend in 2x Protein Ladepuffer resuspendiert und bei 90°C erhitzt. Anschließend erfolgte ein immunologischer Nachweis des N-terminalen HA-Epitops der PROZIP1-Varianten.

4.7.10 Nachweis der Aktivierung (Phosphorylierung) von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) in Mais

Für die MAP-Kinase-Assays wurden pro Behandlung fünf Maisblattscheiben (Durchmesser: 5 mm) des zweiten Keimblattes etwa 10 Tage alter Maispflanzen (Early Golden Bantam) mit einem Korkbohrer ausgestanzt und 24h in 5 ml H₂O_{bidest.} regeneriert. Anschließend wurde das Wasser vollständig durch 5 ml Elizitorlösung ersetzt (gleiche Zusammensetzung wie bei ROS-Assays, nur ohne Peroxidase und Luminol). Die gesamte Menge/Behandlung wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 50 µL SDS-Ladepuffer versetzt, [30 sec. gevortext, 2 min bei 95°C erhitzt] (2x) und anschließend eine Minute bei 12.000g abzentrifugiert. 15 µL jeder Probe wurden pro Gellauf aufgetragen. Der immunologische Nachweis phosphorylierter MAPKs erfolgte mit α-phospho-p44/p42 Antikörpern (siehe Tab. 7).

4.7.11 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies in Maisblattscheiben

Für die ROS-Assays wurde eine Maisblattscheibe mit 5 mm Durchmesser in je eine Öffnung einer 96 Wellplatte gelegt, die mit 100 µl H₂O_{bidest.} befüllt war. Das Wasser wurde nach 24h Regenerationszeit durch 100 µl Elizitorlösung ersetzt und die Photonen-zählung mit einer Chemilumineszenzkamera über 60 Min durchgeführt.

Elizitorlösung	Meerrettich-Peroxidase	10mg/ml
	Luminol/L-012	100 μ M
	Chitin	1 μ M
	oder flg22	1 μ M
	oder Zip1	5 μ M

4.7.12 Quantifizierung des endogenen SA Levels in Maisblättern

Maisblattgewebe wurden in flüssigem N₂ eingefroren, zu einem feinen Pulver gemahlen und in 60 mg Aliquots aufgeteilt. Analytische Proben wurden in 0,5 ml Methanol:Ameisensäure (99:1) mit *beads* homogenisiert. Als internen Standard enthielt die Probe 50 ng isotopisch markierte [²H₄]-Salicylsäure (CDN-Isotope, Pointe-Claire, Quebec, Kanada). Um Chlorophyll zu entfernen, wurde ein gleiches Volumen an hochreinem Wasser (0,5 ml) zugegeben, gevortext und bei 12.000 × g für 15 min zentrifugiert. Ein 150 μ l Aliquot des partikelfreien Überstandes wurde für die Autosamplerbehandlung und LC/MS-Analysen entfernt. Die Flüssigchromatographie (LC, *liquid chromatography*)-Auftrennung wurde mit einem Agilent 1260 Infinitely-Serie HiP-Solvent Degasser (G4225A), 1260 Binärpumpe (G1312B) und einem 1260 Autosampler (G1329B) durchgeführt. Die mobile Binärgradienten-Phase bestand aus 0,1% Ameisensäure in H₂O (Lösung A) und 0,1% Ameisensäure in MeOH (Lösung B). Injektionen zu je fünf μ L wurden auf einer Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD Säule (Agilent: 1,8 μ m, 2,1 x 50 mm) mit einer 0,35 ml min⁻¹ Durchflussrate aufgetrennt. Der mobile Phasengradient war: 0-2 min, 5% B constant ratio; 3 min, 24% B; 18 min, 98% B, 25 min, 98% B und 26 min 5% B für die Säulen Re-equilibrierung vor der nächsten Injektion. Eluierte Analyte wurden über einen thermischen Gradienten mittels Agilent Jet Stream Source unter Verwendung der folgenden Parameter einer *electrospray ionization* (ESI) unterzogen: Düsenspannung (500 V), N₂-Vernebelungsgas (Durchfluss 12 L min⁻¹, 55 psi, 225 °C) und Mantelgas (350 °C), 12 L min⁻¹). Die Transfer-Einlasskapillarspannung betrug 3500 V und beide MS1- und MS2-Heizer wurden auf 100°C erhitzt. *Multiple reaction monitoring* (MRM) Übergänge für freie SA-Vorläufer [MH]⁻ m/z 137.0 und Produkt-Ionen m/z 93 verwendeter Fragmentor (V:72), Kollisionsenergie (V:12) und Zellbeschleuniger (V:7) Sollwerte mit einer mittleren Analyt-Retentionszeit von 8,09 min. Genauso für Isotopen-markiertes SA: MRM-Übergänge für [²H₄]-SA Vorläufer [MH]⁻ m/z 141.1 und Produkt-Ionen m/z 97 verwendeter Fragmentor (V:88), Kollisionsenergie (V:16) und Zellbeschleuniger (V:7)

Sollwerte mit einer durchschnittlichen Analyt-Retentionszeit von 8,02 min. Angesichts der Tatsache, dass der Probenverlust und die Matrixeffekte zwischen einem nativen Analyten und einem parallelen Isotopenstandard sehr ähnlich sind, wurde die freie SA Konzentration (ng g^{-1} FW) auf der Basis des Verhältnisses von SA zu bekannten Mengen an ISTD ($[\text{2H}_4]$ -SA) mit Rücksicht auf Injektionsvolumina, Verdünnungen und Menge an extrahiertem Blattgewebe berechnet.

4.7.13 Massenspektrometrische Analyse von apoplastischem Maisfluid

Aufreinigung der Proben für MS. Die AF Fraktionen $<10\text{kDa}$ wurden mit 0.5% FA und 5% Actonitril versetzt. Die so angesäuerte Peptidlösung wurde in 150 μL Schritten durch prä-equilibrierte C18 Zentrifugationssäulen geschickt. Die Säulen wurden vier mal mit 0.5% FA, 5% ACN gewaschen, um störende Salze loszuwerden. Anschließend konnten die gebundenen Peptide in zwei Schritten mit 50 μL 0.1% FA, 70% ACN eluiert werden. Die Proben wurden über Vacuumkonzentration auf <5 μL ankonzentriert und mit 0.1% FA auf ein Volumen von 20 μL eingestellt.

LC-MS/MS. Die Experimente wurden an einem Thermo LTQ Velos Massenspektrometer durchgeführt, welches mit einem Proxeon EASY-nLC gekoppelt wurde. Das LTQ Velos Massenspektrometer wurde mit der Xcalibur Software (Version 2.1) betrieben. Das Massenspektrometer wurde auf positiven Ionenmodus, Übersichtsscan zwischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 500 und 1500, mit einem Ionisierungspotential von 1,9 kV eingestellt. Die Peptide wurden auf einer single reverse C18-Säule (Innendurchmesser 75 mm, gepackt mit 12 cm ReproSil-Pur C18-AQ [3 μm]) unter Verwendung eines Acetonitrilgradienten (120 min 5 bis 80%, 20 min 80%) aufgetrennt und bei einer Durchflussrate von 300 nL/min durch Kollisions-induzierten Zerfall fragmentiert, wobei die 20 am intensivsten mehrfach geladenen Vorläufer in jedem MS-Scan fragmentiert wurden. Kollisions-induzierte Zerfallsenergie wurde auf 35% für die Erzeugung von MS2-Spektren eingestellt. Nach der Fragmentierung wurden die Vorläufer von einer weiteren MS/MS-Akquisition für 1 min mit einer Liste von ausgewählter Ionen (max. 500) ausgeschlossen.

Peptid- und Proteinidentifizierung. MS2-Spektren wurden mit dem MASCOT-Algorithmus (Version 2.3.02) zunächst gegen eine Datenbank namhafter Verunreinigungen (Standard in MASCOT) analysiert, gefolgt von der Suche nach Maissequenzen aus der Datenbank ZmB73_5b_FGS_translations_20110205.fasta (www.maizesequence.org/). MASCOT Blasts erlauben die Rücksichtnahme auf Oxidation von Met-Resten (16 Da) und statische Modifikationen von Cys-Resten (57 Da aufgrund der Alkylierung mit Iodacetamid). Die Enzymspezifität wurde auf "none" gesetzt und eine Massentoleranz von $\pm 0,25$ Da für die Vorläufermasse und $\pm 0,35$ Da für Produkt-Ionenmassen eingestellt. *Decoy Database Search* wurde aktiviert. Die resultierenden MS2-Spektrenübereinstimmungen wurden zusammengesetzt und gefiltert. Peptide mit einem Ion score über 35 wurden beibehalten.

4.8 Pflanzenmethoden

4.8.1 Maisvarietäten

Für sämtliche Experimente in dieser Arbeit wurde ausschließlich die Maisvarietät *Early Golden Bantam* (Urban Farmer Seeds, Westfield, USA) verwendet.

4.8.2 Kultivierung von *Zea mays*

Sämtliche Maispflanzen wurden unter kontrollierten Bedingungen kultiviert, wobei die Nachtphase mit 20°C und 60% Luftfeuchte 9 h und die Tagesphase mit 28°C und 40% Luftfeuchte 15h andauerte. Eingeschlossen in die Tagesphase waren 2,5h für die Simulation des Sonnenaufgangs und 2,5h für die Simulation des Sonnenuntergangs (*ramping*). Pro Topf wurden je vier Maiskörner in Frühstorfer Pikiererde des Typs „P“ oder „T“ ausgesät und einmal täglich gewässert.

4.8.3 Kultivierung von *Nicotiana benthamiana*

Die Samen von *N. benthamiana* wurden gleichmäßig auf Frühstorfer Pikiererde des Typs „P“ ausgesät und unter einmaliger, täglicher Bewässerung 7 Tage auskeimen gelassen. Einzelne Keimlinge wurden in neue Töpfe pikiert und konnten nach ca. 10 Tagen unter kontrollierten Bedingungen (21°C, 16h Tag, 8h Nacht) für Infiltrationsexperimente genutzt werden.

4.8.4 Salicylsäure-Infiltration und Peptidbehandlung von Mais

Um eine Induktion Abwehr-assoziiierter PLCPs zu erreichen, wurde das dritte Blatt von etwa sieben Tage alten Maispflanzen mit 2 mM Salicylsäure (SA) in 1% (v/v) Ethanol. Hierzu wurde die Lösung von der Blattunterseite mithilfe einer 1ml-Spritze ohne Nadel unter leichtem Druck ins Blatt gedrückt. Für SA- und Peptidbehandlungen mit 5 μ M Zip1/Zip1mut und anschließenden Transkriptomanalysen wurde das zweite und vierte Blatt verwendet.

4.8.5 Isolation und Fraktionierung von apoplastischem Fluid aus Mais

Zur Präparation apoplastischer Flüssigkeit aus Maispflanzen wurden zur Analyse vorhergesehene Blätter verwendet, bei denen das dritte Blatt horizontal abgeschnitten wurde. Anschließend wurde das Blattmaterial in einem Exsikkator fünf Mal für je 15 min bei 250 mbar in H₂O_{bid.} evakuiert. Die so behandelten Blattabschnitte wurden anschließend gestapelt und vertikal in eine 20ml-Spritze ohne Kolben gesteckt, welche mit der Öffnung nach unten in ein 50ml Falcon gestellt wurde. Die apoplastische Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 2500 xg und 4°C gewonnen und konnte anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden. Zur Fraktionierung mittels Anionenaustausch-Chromatographie wurde der Proteingehalt der apoplastischen Flüssigkeit durch Bradfordanalyse (Bradford, 1976) bestimmt. Die Menge, die einem totalen Proteingehalt von 5 mg entsprach, wurde mit einem Spritzenvorsatzfilter steril filtriert, mit H₂O_{bid.} auf ein Volumen von 10ml aufgefüllt und schließlich auf eine zuvor mit 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0) äquilibrierte MonoQ-Resin-Säule (GE Healthcare) gegeben. Es folgte die Elution der an die Säule gebundenen Proteine durch einen linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0). Hierbei wurden Fraktionen zu je 500 μ l in einem Gesamtvolumen von 20ml gesammelt, welche anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert wurden.

4.8.6 Infiltration von *N. benthamiana* mit *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* und die anschließende Infiltration von *N. benthamiana* erfolgte nach einem Protokoll von I. A. Sparkes. Infizierte Blätter wurden 3d nach Infiltration geerntet (Sparkes *et al.*, 2006). Wenn ein

Fluoreszenzfusionsprotein exprimiert wurde, konnte die erfolgreiche Expression mithilfe eines Fluoreszenzscans an der ChemiDoc™ MP (Biorad) visualisiert werden.

4.8.7 Präparation von apoplastischem Fluid aus *N. benthamiana*

Für die Präparation von apoplastischem Tabakfluid wurden die Blätter 3 Tage nach *A. tumefaciens* Infiltration geerntet, längst geteilt und von ihren Petiolen befreit. Nach Frischgewichtsbestimmung der geernteten Blätter wurden diese in einer Vakuumkammer 3-5 mal für je 15 min bei 200 mbar unter H₂O_{bid} evakuiert. Danach wurden die evakuierten Blatthälften gestapelt, zusammengerollt und mit der Schnittkante nach unten in eine 50 ml Spritze gesteckt. Die Spritze wurde mit der kleinen Öffnung nach unten in ein 50 ml Falcon gesteckt. Durch Zentrifugation für 20 min bei 2000*g und 4 °C wurde das apoplastische Fluid aus den Blättern gedrückt und im Falcon aufgefangen. Auf diese Weise erhielt man aus ca. 3-4 Blättern etwa 1-2 ml Fluid. Nach Volumenbestimmung des extrahierten Fluids wurde das Verhältnis von isolierter Flüssigkeit zu Frischgewicht der geernteten Blätter berechnet und mit H₂O_{bid} ein Verhältnis von 150 µL Fluid pro 1g Frischgewicht eingestellt. Das eingestellte Fluid wurde bei -20°C gelagert.

4.9 Mikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurde ein invertiertes Mikroskop des Typs Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments Microscopes and Digital Imaging Systems, Eiringhausen) verwendet. Die verwendeten Filter sind in Tab. 9 aufgeführt. Hochauflösende Digitalbilder wurden für Fluoreszenzbilder mit einer Hamamatsu C11440 ORCA-flash4.0LT Kamera (Hamamatsu Photonics) und für lichtmikroskopische Aufnahmen mit einer Jenoptic ProgRes CT5 Kamera (Jenoptic Optical Systems GmbH) aufgenommen.

Tab. 9. Für die unterschiedlichen Anwendungen verwendete Fluoreszenzfilter und die jeweiligen Emissionspektren.

Filter	Anregungswellenlänge	Emissionwellenlänge	Verwendung
eGFP HC Filterset	455-490 nm	495-530 nm	Detektion von GFP-Fusionsproteinen
CFP-2432C	425-450 nm	510-550 nm	Zellwand Autofluoreszenz

4.10 Bioinformatische Analysen

4.10.1 Allgemeine Bioinformatik

Zur Planung von Klonierungsstrategien und um Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenzvergleiche durchzuführen, wurde das Programm Clone Manager 9.0 der Firma Sci-Ed-Software verwendet. Die hierfür notwendigen Sequenzen wurden dem *National Center of Biotechnology Information* (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/) und der *Maize Genetics and Genome Database* (<http://www.maizegdb.org/>) entnommen. Die von diesen Webseiten zur Verfügung gestellten BLAST (engl. *B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool; Altschul *et al.*, 1990)-Funktionen wurden zur Identifizierung von ähnlichen Protein- und Nukleotidsequenzen verwendet. Domänenanalysen wurden mit dem Programm SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) oder ExPASy (engl. *E*xpert *P*rotein *A*nalysis *S*ystem) (<https://www.expasy.org/>) durchgeführt und Proteine wurden mittels der Programme SignalP 4.1 (Nielsen *et al.*, 1997; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) und SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2005; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) auf eine N-terminale Signalsequenz bzw. anderweitige Lokalisierungssequenzen hin analysiert. Analyse und Vergleich von Proteasen erfolgte mit der MEROPS-Datenbank (Rawlings *et al.*, 2011; <http://merops.sanger.ac.uk/>).

4.10.2 Bioinformatische Analysen für die in dieser Arbeit generierten RNAseq Daten

Qualitätskontrolle der sequenzierten Reads. Ein erster Qualitätstest wurde mit Fastqc (v0.11.3; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) durchgeführt. Danach wurde die Adapterentfernung (auf der Suche nach Resten der Illumina-Sequenzadapter) und eine *low quality* Trimmung mit bbtools/bbduk (v36.84; <http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>) durchgeführt. Reads mit einer Länge <30bp wurden nach dem Trimmen aus weiteren Analysen entfernt. Um eine potenzielle Verunreinigung auszuschließen, die zu falsch positiven *Mappings* führen könnte, wurden Biobloomtools (v2.0.12) (Chu *et al.*, 2014) mit sequentieller Filterung (-c Parameter) und den folgenden Filtern verwendet: *Zea mays* rRNA (RefSeq), *Zea mays* Chloroplast (RefSeq), *Zea mays* nicht-chromosomale Sequenzen (AGPv3,30),

Zea mays Chromosomen (AGPv3,30), *Malessia globosa* (CBS7966), *Aspergillus fumigatus* (Af293), *Pichia pastoris* (GS115), *Homo sapiens* (hg38), *Escherichia coli* (BL21), *Mycoplasma pneumoniae* (M129), *Sphingobium* sp (SYK6), *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110), ViralDB (RefSeq, >5k Genom). In keiner der analysierten Proben konnte eine Kontamination festgestellt werden. Insertgrößenverteilungen wurden mit bbmerge (v36.84; <http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>) berechnet und zeigten einen erwarteten Peak bei ca. 130bp. Mit Preseq (v2.0.2) (Daley *et al.*, 2013) konnte die nötige Komplexität der *library* für alle Proben geschätzt werden. Die *Gene Body Coverage* wurde mit RSeqQC (v2.6.4) (Wang *et al.*, 2012) und einer Auswahl von 582 *Housekeeping*-Genen (Lin *et al.*, 2014) ausgewertet und zeigte eine hohe vergleichbare Abdeckung in allen Proben und nur einen leichten 3'-Bias. Weil keine größeren systematischen Fehler identifiziert werden konnten, wurden Adapter/Qualitäts-getrimmte *Reads* folgend für das *Mapping* verwendet.

Read Alignment und Gene Counts. *Reads* wurden gegen alle Chromosomen und nicht-chromosomalen *Scaffolds* aus dem AGP-Maisgenom (Genom-Version v3.30, toplevel DNA) gemappt. Star (v2.5.1b) (Dobin *et al.*, 2013) wurde verwendet, um hochqualitative *Reads* gegen die Referenz mit der folgenden Befehlszeile abzubilden:

```
$ / STAR --genomeDir [...] / ZeaMays_Star251b_Genome_sjdbOver74 --readFilesIn [...] / Sample1_1.fastq [...] / Sample1_2.fastq --outFileNamePrefix [...] / Star251b_Sample1_-twopassMode Basic --outSAMmapqUnique 60 --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --sjdbOverhang 74 --outFilterMultimapNmax 20 --outFilterType BySJout --outReadsUnmapped Fastx --winAnchorMultimapNmax 100 --seedSearchLmax 30 --seedSearchStartLmax 30 --seedPerReadNmax 2000 --seedPerWindowNmax 100 --outFilterMismatchNmax 60 --chimSegmentMin 12 --chimJunctionOverhangMin 12 --alignSJoverhangMin 8 --alignSJDBoverhangMin 4 --alignIntronMin 20 --alignMatesGapMax 200000 --alignIntronMax 200000 - RunThreadN 16.
```

Etwa 90% der *Reads* konnten für jede Probe eindeutig zugeordnet werden. Pro-Gen-*Reads* wurden anschließend mit featureCounts (v1.5.0) (Liao *et al.*, 2014) und AGPv3.30 *matching annotations* berechnet. Die *Counts* wurden unter "gene_name"

und "exon" zusammengefasst, der Mindest-Mapping-Qualitätsschwellenwert betrug „5“ und es wurden nur primäre *Alignments* für das Zählen erlaubt. Für alle außer eine Probe konnten etwa 78% der eindeutig gemappten *Reads* den bereitgestellten Annotationen zugeordnet werden. Für S09 (Mock Kontrolle), konnten 10% weniger *Reads* (~ 66%) zugeordnet werden, was in einer höheren Anzahl von *low mapping Reads* in dieser Probe begründet ist.

Differenzielle Expression, statistische Analysen und Visualisierung. Pakete aus der statistischen Sprache R (v3.3.2) (R-Core-Team, 2016) wurden für alle Berechnungen in benutzerdefinierten Skripten verwendet. Für das Clustering wurden fastcluster (v1.1.22) (Muellner, 2013), pvclust (v2.0.0) (Shimodaira, 2006) and fpc (v2.1.10) (Hennig, 2015) verwendet. Für hierarchische Gruppierungen wurden zwei Distanzmethoden (euklidisch, canberra) und drei Agglomerationsmethoden (*complete*, *average*, *ward.D2*) getestet und die Kombination "euklidisch / *ward.D2*" als die robusteste gewählt. Die *Snow Library* (v0.4.2) (Tierney, 2009) wurde für die Parallelisierung von pvclust (10k *bootstraps*) verwendet. Für die Berechnung der differenziellen Expression wurde DESeq2 (v1.14.1) (Love *et al.*, 2014) verwendet. Die Analyse des Salicylsäure (SA)-Datensatzes zeigte im Vergleich zur Mock-Kontrolle ($-2 > \text{Foldchange} > 2$, $\text{adj.P} < 0,05$) 988 induzierte und 235 reprimierte Gene. Ähnlich zeigte die Analyse des Zip1-Datensatzes 1023 hochregulierte und 277 reprimierte Gene im Vergleich zur Mock-Kontrolle ($-2 > \text{Foldchange} > 2$, $\text{adj.P} < 0,05$). *Heatmaps* wurden mit der pheatmap Bibliothek erstellt (v1.0.8) (Kolde, 2015). Gen-Ontologien wurden mittels Biomart (Plantmart) (v2.30.0) (Durinck *et al.*, 2009) zugeordnet. *Parametric Analysis of Gene Set Enrichment* (PAGE) von induzierten und reprimierten Genen im Vergleich zur Mock Kontrolle wurde mit agriGO (mit *Zea mays* AGPv3.30 als Hintergrund und Standard-erweiterten Optionen) durchgeführt (v2.30.0) (Du *et al.*, 2010). Die *R-Library gage* (v2.24.0) (Luo *et al.*, 2009) und *pathview* (v1.14.0) (Luo *et al.*, 2013) wurden verwendet, um signifikant angereicherte *pathways* zu identifizieren. Wenn nicht anders vermerkt, wurde eine FDR-adjustierte Signifikanzschwelle (adj.p) von $< 0,05$ verwendet.

Tab. 10. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Programme für die RNAseq-Analyse

Programm	Version	Referenz oder Website
Qualitätskontrolle der seq. Reads		
Fastqc	0.11.3	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc
bbtools/bbduk	36.84	http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/
biobloomtools	2.0.12	(Chu et al., 2014)
bbtools/bbmerge	36.84	http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/
preseq	2.0.2	(Daley and Smith, 2014)
RSeqQC	2.6.4	(Wang et al., 2012)
RSeqQC/Housekeeping	-	(Lin et al., 2014)
Read alignment und gene counts		
Star	2.5.1b	(Dobin et al., 2013)
featureCounts	1.5.0	(Liao et al., 2014)
Differenzielle Expression, statistische Analysen und Visualisierung		
R	3.3.2	(R Core Team, 2016)
R/fastcluster	1.1.22	(Müllner, 2013)
R/pvclust	2.0-0	(Suzuki and Shimodaira, 2015)
R/fpc	2.1-10	(Hennig, 2015)
R/snnow	0.4-2	(Tierney et al., 2016)
R/pheatmap	1.0.8	(Kolde, 2015)
R/biomaRt	2.30.0	(Durinck et al., 2009)
DESeq2	1.14.1	(Love et al., 2014)
agriGO	1	(Du et al., 2010)
R/pathview	1.14.0	(Luo and Brouwer, 2013)
R/gage	2.24.0	(Luo et al., 2009)

5 Literaturverzeichnis

Acosta, I., Laparra, H., Romero, S., Schmelz, E., Hamberg, M., Mottinger, J., Moreno, M., and Dellaporta, S. (2009). tasselseed1 Is a Lipxygenase Affecting Jasmonic Acid Signaling in Sex Determination of Maize. *Science* 323, 262-265.

Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Lebrun, M.H., Job, D., and Rakwal, R. (2010). Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* 10, 799-827.

Albrecht, C., Boutrot, F., Segonzac, C., Schwessinger, B., Gimenez-Ibanez, S., Chinchilla, D., Rathjen, J.P., de Vries, S.C., and Zipfel, C. (2012). Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 303-308.

Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Oxford University Press* 25, 3389–3402.

Antunes, L.C., Ferreira, R.B., Buckner, M.M., and Finlay, B.B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 156, 2271-2282.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415, 977-983.

Assaad, F.F., Qiu, J.L., Youngs, H., Ehrhardt, D., Zimmerli, L., Kalde, M., Wanner, G., Peck, S.C., Edwards, H., Ramonell, K., et al. (2004). The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Mol Biol Cell* 15, 5118-5129.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (2002). Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. Wiley

Avrova, A.O., Taleb, N., Rokka, V.M., Heilbronn, J., Campbell, E., Hein, I., Gilroy, E.M., Cardle, L., Bradshaw, J.E., Stewart, H.E., et al. (2004). Potato oxysterol binding protein and cathepsin B are rapidly up-regulated in independent defence pathways that distinguish R gene-mediated and field resistances to *Phytophthora infestans*. *Molecular plant pathology* 5, 45-56.

Balls, A.K., and Lineweaver, H. (1939). ISOLATION AND PROPERTIES OF CRYSTALLINE PAPAIN *The Journal of biological chemistry* 130, 669.

Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., and Fletcher, A.A. (1922a). Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* 12, 141–146.

Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Macleod, J.J.R., and Noble, E.C. (1922b). The Effects of Insulin on Experimental Hyperglycemia in Rabbits. *American Journal of Physiology*, 559-580.

Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., and Clark, B.J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 21, 389-395.

Beckers, G.J., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W.R., He, S.Y., Zhang, S., and Conrath, U. (2009). Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 21, 944-953.

Belien, T., Van Campenhout, S., Van Acker, M., and Volckaert, G. (2005). Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 407-414.

Bendtsen, J.D., Jensen, L.J., Blom, N., Von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 17, 349-356.

Bendtsen, J.D., Kiemer, L., Fausbøll, A., and Brunak, S. (2005). Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology* 5, 58.

Bennett, R.N., and Wallsgrove, R.M. (1994). Secondary metabolites in plant defense-mechanisms. *The New phytologist* 127, 617-633.

Boersema, P.J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., and Heck, A.J. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc* 4, 484-494.

Bohm, H., Albert, I., Oome, S., Raaymakers, T.M., Van den Ackerveken, G., and Nurnberger, T. (2014). A conserved peptide pattern from a widespread microbial virulence factor triggers pattern-induced immunity in *Arabidopsis*. *PLoS pathogens* 10, e1004491.

Boller, T., and Felix, G. (2009a). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Rev Plant Biol* 60, 379-406.

Boller, T., and He, S.Y. (2009b). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324, 742-744.

Bostock, R.M. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annual review of phytopathology* 43, 545-580.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Breiden, M., and Simon, R. (2016). Q&A: How does peptide signaling direct plant development? *BMC Biol* 14, 58.

Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc Natl Acad Sci* 107, 9452–9457.

Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X. (1997). The Arabidopsis NPR1 Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. *Cell* 88, 57-63.

Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., and Dodds, P.N. (2014). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the “integrated decoy” hypothesis *Front Plant Sci* 5.

Chen, Y.C., Siems, W.F., Pearce, G., and Ryan, C.A. (2008). Six peptide wound signals derived from a single precursor protein in *Ipomoea batatas* leaves activate the expression of the defense gene sporamin. *The Journal of biological chemistry* 283, 11469-11476.

Chen, Z.Y., Brown, R.L., Rajasekaran, K., Damann, K.E., and Cleveland, T.E. (2006). Identification of a Maize Kernel Pathogenesis-Related Protein and Evidence for Its Involvement in Resistance to *Aspergillus flavus* Infection and Aflatoxin Production. *Phytopathology* 96, 87-95.

Cheval, C., Aldon, D., Galaud, J.P., and Ranty, B. (2013). Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1766-1771.

Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497-500.

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803-814.

Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D.C., Lecaille, F., Bogyo, M., Bromme, D., Ellman, J.A., and Craik, C.S. (2006). Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *The Journal of biological chemistry* 281, 12824-12832.

Chowdhury, J., Henderson, M., Schweizer, P., Burton, R.A., Fincher, G.B., and Little, A. (2014). Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *The New phytologist* 204, 650-660.

Christensen, J.J. (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Am Phytopathol Soc Monogr* 2, 1-41.

- Christensen, S.A., Huffaker, A., Kaplan, F., Sims, J., Ziemann, S., Doeblemann, G., Ji, L., Schmitz, R.J., Kolomiets, M.V., Alborn, H.T., et al.** (2015). Maize death acids, 9-lipoxygenase-derived cyclopentenones, display activity as cytotoxic phytoalexins and transcriptional mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11407-11412.
- Chu, J., Sadeghi, S., Raymond, A., Jackman, S.D., Nip, K.M., Mar, R., Mohamadi, H., Butterfield, Y.S., Robertson, A.G., and Birol, I.** (2014). BioBloom tools: fast, accurate and memory-efficient host species sequence screening using bloom filters. *Bioinformatics* 30, 3402-3404.
- Cirino, G., and Vergnolle, N.** (2006). Proteinase-activated receptors (PARs): crossroads between innate immunity and coagulation. *Curr Opin Pharmacol* 6, 428-434.
- Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M.** (1995). CLAVATA 3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1 Development, 2057-2067.
- Coe, E.H.J.** (2001). The origins of maize genetics. *Science* 2.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci* 69, 2110-2114.
- Conrath, U., Beckers, G.J., Langenbach, C.J., and Jaskiewicz, M.** (2015). Priming for enhanced defense. *Annual review of phytopathology* 53, 97-119.
- Cordero, M.J., Raventos, D., and Sansegundo, B.** (1994). Differential expression and induction of chitinases and beta-1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 7, 23-31.
- Couto, D., and Zipfel, C.** (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol* 16, 537-552.
- Cravatt, B.F., Wright, A.T., and Kozarich, J.W.** (2008). Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem* 77, 383-414.
- Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J.E.** (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu Rev Plant Biol* 66, 487-511.
- Daley, T., and Smith, A.D.** (2013). Predicting the molecular complexity of sequencing libraries. *Nat Methods* 10, 325-327.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.

De Coninck, B., and De Smet, I. (2016). Plant peptides - taking them to the next level. *Journal of experimental botany* 67, 4791-4795.

de Wit, P.J. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* 64, 2726-2732.

Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C., and Klessig, D.F. (2011). Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book* 9, e0156.

Devos, K.M. (2005). Updating the 'crop circle'. *Curr Opin Plant Biol* 8, 155-162.

Dixon, M.S., Golstein, C., Thomas, C.M., van der Biezen, E.A., and Jones, J. (2000). Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of Rcr3 specifically by a tomato gene required specifically by Cf-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8807–8814.

Djamei, A., and Kahmann, R. (2012). *Ustilago maydis*: Dissecting the Molecular Interface between Pathogen and Plant. *PLoS pathogens* 8, e1002955.

Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., et al. (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478, 395-398.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.

Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11, 539-548.

Doehlemann, G., and Hemetsberger, C. (2013). Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *The New phytologist*.

Doehlemann, G., Reissmann, S., Assmann, D., Fleckenstein, M., and Kahmann, R. (2011). Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Molecular microbiology* 81, 751-766.

Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R., et al. (2008). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* 56, 181-195.

Doherty, H.M., Selvendran, R.R., and Bowles, D.J. (1988). The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Phys and Mol Plant Pathol* 33, 377-384.

Dolezal, A.L., Shu, X., GR, O.B., Nielsen, D.M., Woloshuk, C.P., Boston, R.S., and Payne, G.A. (2014). *Aspergillus flavus* infection induces transcriptional and physical changes in developing maize kernels. *Front Microbiol* 5, 384.

Domoto, C., Watanabe, H., Abe, M., Abe, K., and Arai, S. (1995). Isolation and characterization of two distinct cDNA clones encoding corn seed cysteine proteinases. *Biochim Biophys Acta* 1263, 241-244.

Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* 7, 547-552.

Du, L., Ali, G.S., Simons, K.A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S., and Poovaiah, B.W. (2009). Ca(2+)/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* 457, 1154-1158.

Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., and Su, Z. (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res* 38, W64-70.

Durinck, S., Spellman, P.T., Birney, E., and Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc* 4, 1184-1191.

Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Oppen, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C.S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* 45, 616-629.

Endler, A., and Persson, S. (2011). Cellulose synthases and synthesis in Arabidopsis. *Molecular plant* 4, 199-211.

Farmer, E.E., Johnson, R.R., and Ryan, C.A. (1992). Regulation of Expression of Proteinase Inhibitor Genes by Methyl Jasmonate and Jasmonic Acid. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 98, 995-1002.

Farrell, B.D., Dussourd, D.E., and Mitter, C. (1991). ESCALATION OF PLANT DEFENSE: DO LATEX AND RESIN CANALS SPUR PLANT DIVERSIFICATION? *138*.

Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* 18, 265 - 276.

Flor, H.H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual review of phytopathology* 9, 275-296.

Flowers, J.L., and Vaillancourt, L.J. (2005). Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. *Current genetics* 48, 380-388.

Fu, Z.Q., and Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* 64, 839-863.

Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N., et al. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486, 228-232.

Fukuda, H., and Higashiyama, T. (2011). Diverse functions of plant peptides: entering a new phase. *Plant Cell Physiol* 52, 1-4.

Garcion, C., Lohmann, A., Lamodiére, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., and Metraux, J.P. (2008). Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of Arabidopsis. *Plant physiology* 147, 1279-1287.

Gay, N.J., and Gangloff, M. (2007). Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 76, 141-165.

Genre, A., Chabaud, M., Balzerque, C., Puech-Pages, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Becard, G., Bonfante, P., et al. (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *The New phytologist* 198, 190-202.

Gfeller, A., Liechti, R., and Farmer, E.E. (2010). Arabidopsis Jasmonate Signaling Pathway. *Science* 3.

Gilroy, E.M., Hein, I., van der Hoorn, R., Boevink, P.C., Venter, E., McLellan, H., Kaffarnik, F., Hrubikova, K., Shaw, J., Holeva, M., et al. (2007). Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. *Plant J* 52, 1-13.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology* 43, 205-227.

Gomez-Gomez, L., and Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* 5, 1003-1011.

Gómez-Gómez, L., Felix, G., and Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18, 277-284.

Greeff, C., Roux, M., Mundy, J., and Petersen, M. (2012). Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Front Plant Sci* 3, 209.

Greenbaum, D., Medzihradzsky, K.F., Burlingame, A., and Bogyo, M. (2000). Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chem Biol* 7, 569–581.

Gust, A.A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H.M., and Nurnberger, T. (2012). Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in plant science* 17, 495-502.

Hancock, J.G., and Huisman, O.C. (1981). Nutrient Movement in Host-Pathogen Systems. *Ann Rev Phytopathol* 19, 309-331.

Hartig, S.M. (2013). Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 14*, Unit14 15.

Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., Arima, S., Squeglia, F., Ruggiero, A., Tokuyasu, K., et al. (2014). Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E404-E413.

Hennig, C. (2015). Flexible Procedures for Clustering.

Herbert, E., and Uhler, M. (1982). Biosynthesis of Polyprotein Precursors to Regulatory Peptides *Cell* 30, 1-2.

Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., and Peterson, S.B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews Microbiology* 8, 15-25.

Hsu, J.L., Huang, S.Y., Chow, N.H., and Chen, S.H. (2003). Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Anal Chem* 75, 6843-6852.

Hu, X., and Reddy, A.S.N. (1995). Nucleotide Sequence of a cDNA Clone Encoding a Thaumatin-Like Protein from Arabidopsis. *Plant physiology* 107 305-306.

Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu, J.Q., and Chen, Z. (2010). Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant physiology* 153, 1526-1538.

Hückelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual review of phytopathology* 45, 101-127.

Huffaker, A., Dafoe, N.J., and Schmelz, E.A. (2011). *ZmPep1*, an ortholog of *Arabidopsis* elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance. *Plant physiology* 155, 1325-1338.

Huffaker, A., Pearce, G., and Ryan, C.A. (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10098-10103.

Huffaker, A., Pearce, G., Veyrat, N., Erb, M., Turlings, T.C., Sartor, R., Shen, Z., Briggs, S.P., Vaughan, M.M., Alborn, H.T., et al. (2013). Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect antiherbivore defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5707-5712.

Huffaker, A., and Ryan, C.A. (2007). Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* *104*, 10732-107326.

Igawa, T., TOKAI, T., KUDO, T., YAMAGUCHI, I., and KIMURA, K. (2005). A Wheat Xylanase Inhibitor Gene, Xip-I, but Not Taxi-I, Is Significantly Induced by Biotic and Abiotic Signals That Trigger Plant Defense. *Biosci Biotechnol Biochem* *69*, 1058–1063.

Irving, H.R., and Gehring, C. (2012). *Plant Signaling Peptides* (Berlin: Springer-Verlag).

J.B., H., and Glazer, A.N. (1969). Papaya Lysozyme: Terminal Sequences and Enzymatical Properties. *244*, 1399-1409.

Jabaiah, A.M., Getz, J.A., Witkowski, W.A., Hardy, J.A., and Daugherty, P.S. (2012). Identification of protease exosite-interacting peptides that enhance substrate cleavage kinetics. *Biol Chem* *393*, 933-941.

Jacob, F., Vernaldi, S., and Maekawa, T. (2013). Evolution and Conservation of Plant NLR Functions. *Front Immunol* *4*.

Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* *19*, 4004-4014.

Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* *444*, 323-329.

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* *103*, 11086-11091.

Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., Ilyas, M., Win, J., Kamoun, S., and van der Hoorn, R.A.L. (2010). An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant physiology* *154*, 1794-1804.

Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. (2000). Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of PR Gene Expression. *The Plant cell* *12*, 2339–2350.

Koeck, M., Hardham, A.R., and Dodds, P.N. (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular microbiology* [*in press*].

Kolde, R. (2015). Pretty Heatmaps.

Koncz, C., and Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molec Gen Genet* *204*, 383-396.

Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., and Kohno, K. (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant Journal* 37, 370-378.

Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F.C., van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant physiology* 147, 1358-1368.

Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arents, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K.A., et al. (2010). Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *The Journal of biological chemistry* 285, 13471-13479.

Kunkel, B.N., and Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5, 325-331.

Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P., Staskawicz, B., et al. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature biotechnology* 28, 365-369.

Lear, S., and Cobb, S.L. (2016). Pep-Calc.com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. *J Comput Aided Mol Des* 30, 271-277.

Lee, J., Eschen-Lippold, L., Lassowskat, I., Böttcher, C., and Scheel, D. (2015). Cellular reprogramming through mitogen-activated protein kinases. *Front Plant Sci* 6.

Li, L., Yu, Y., Zhou, Z., and Zhou, J.M. (2016). Plant pattern-recognition receptors controlling innate immunity. *Sci China Life Sci* 59, 878-888.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923-930.

Lin, F., Jiang, L., Liu, Y., Lv, Y., Dai, H., and Zhao, H. (2014). Genome-wide identification of housekeeping genes in maize. *Plant Mol Biol* 86, 543-554.

Lionetti, V., and Metraux, J.P. (2014). Plant cell wall in pathogenesis, parasitism and symbiosis. *Front Plant Sci* 5, 612.

Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P., and Howell, S.H. (2007). Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant J* 51, 897-909.

- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R.** (2003). Ethylene response factor 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant cell* 15, 165-178.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S.** (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.
- Lozano-Duran, R., Macho, A.P., Boutrot, F., Segonzac, C., Somssich, I.E., and Zipfel, C.** (2013). The transcriptional regulator BZR1 mediates trade-off between plant innate immunity and growth. *eLife* 2, e00983.
- Lozano-Duran, R., and Zipfel, C.** (2015). Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends in plant science* 20, 12-19.
- Lu, H., Chandrasekar, B., Oeljeklaus, J., Misas-Villamil, J.C., Wang, Z., Shindo, T., Bogyo, M., Kaiser, M., and van der Hoorn, R.A.** (2015). Subfamily-Specific Fluorescent Probes for Cysteine Proteases Display Dynamic Protease Activities during Seed Germination. *Plant physiology* 168, 1462-1475.
- Luo, W.J., and Brouwer, C.** (2013). Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* 29, 1830-1831.
- Luo, W.J., Friedman, M.S., Shedden, K., Hankenson, K.D., and Woolf, P.J.** (2009). GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *Bmc Bioinformatics* 10.
- Ma, J., and Bennetzen, J.L.** (2004). Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12404-12410.
- Macho, A.P., and Zipfel, C.** (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Mol Cell* 54, 263-272.
- Maeda, H., and Dudareva, N.** (2012). The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* 63, 73-105.
- Malinovsky, F.G., Fangel, J.U., and Willats, W.G.** (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Front Plant Sci* 5.
- Marmioli, N., and Maestri, E.** (2014). Plant peptides in defense and signaling. *Peptides* 56, 30-44.
- Matei, A., and Doehlemann, G.** (2016). Cell biology of corn smut disease-*Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Current opinion in microbiology* 34, 60 - 66.
- Matsubayashi, Y.** (2014). Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* 65, 385-413.

- Matsubayashi, Y., and Sakagami, Y.** (1996). Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci* 93.
- Mauch-Mani, B., and Slusarenko, A.** (1996). Production of Salicylic Acid Precursors is a Major Function of Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell Online* 8, 203-212.
- McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M., and Ryan, C.A.** (1992). Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 255, 1570-1573.
- Misas-Villamil, J.C., van der Hoorn, R.A.L., and Doehlemann, G.** (2016). Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. *New Phytologist*, n/a-n/a.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* 104, 19613-19618.
- Moore, J.W., Loake, G.J., and Spoel, S.H.** (2011). Transcription dynamics in plant immunity. *The Plant cell* 23, 2809-2820.
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X.** (2003). Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes. *Cell* 113, 935-944.
- Mueller, A.N., Ziemann, S., Treitschke, S., Assmann, D., and Doehlemann, G.** (2013). Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS pathogens* 9, e1003177.
- Muellner, D.** (2013). fastcluster: Fast Hierarchical, Agglomerative Clustering Routines for R and Python. *Journal of Statistical Software* 53.
- Mustafa, N.R., Kim, H.K., Choi, Y.H., and Verpoorte, R.** (2009). Metabolic changes of salicylic acid-elicited *Catharanthus roseus* cell suspension cultures monitored by NMR-based metabolomics. *Biotechnol Lett* 31, 1967-1974.
- Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., and Kamoun, S.** (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep* 7, 482.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G.** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1-6.
- Nishimura, M.T., and Dangl, J.L.** (2010). *Arabidopsis* and the plant immune system. *Plant J* 61, 1053-1066.
- Nuhse, T.S.** (2012). Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. *Front Plant Sci* 3, 280.

Okamoto, T., and Minamikawa, T. (1995). Purification of a processing enzyme (VmPE-1) that is involved in post-translational processing of a plant cysteine endopeptidase (SH-EP). *Eur J Biochem* 231, 300-305.

Okmen, B., and Doehlemann, G. (2014). Inside plant: biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 20C, 19-25.

Olsen, S., Popper, Z.A., and Krause, K. (2016). Two sides of the same coin: Xyloglucan endotransglucosylases/hydrolases in host infection by the parasitic plant *Cuscuta*. *Plant signaling & behavior* 11, e1145336.

Osborn, A.E. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack.

Paireder, M., Mehofer, U., Tholen, S., Porodko, A., Schahs, P., Maresch, D., Biniossek, M.L., van der Hoorn, R.A., Lenarcic, B., Novinec, M., et al. (2016). The death enzyme CP14 is a unique papain-like cysteine proteinase with a pronounced S2 subsite selectivity. *Arch Biochem Biophys* 603, 110-117.

Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., and Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238, 627-642.

Pauly, M., and Keegstra, K. (2010). Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. *Curr Opin Plant Biol* 13, 305-312.

Pearce, G., Bhattacharya, R., Chen, Y.C., Barona, G., Yamaguchi, Y., and Ryan, C.A. (2009). Isolation and characterization of hydroxyproline-rich glycopeptide signals in black nightshade leaves. *Plant physiology* 150, 1422-1433.

Pearce, G., Moura, D., Stratmann, J., and Ryan, C. (2001a). Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature* 411, 817-820.

Pearce, G., Moura, D.S., Stratmann, J., and Ryan, C.A., Jr. (2001b). RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 12843-12847.

Pearce, G., Munske, G., Yamaguchi, Y., and Ryan, C.A. (2010). Structure-activity studies of *GmSubPep*, a soybean peptide defense signal derived from an extracellular protease. *Peptides* 31, 2159-2164.

Pearce, G., and Ryan, C.A. (2003). Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. *The Journal of biological chemistry* 278, 30044-30050.

Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., and Ryan, C.A. (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253, 895-897.

Pearce, G., Yamaguchi, Y., Munske, G., and Ryan, C.A. (2008). Structure-activity studies of *AtPep1*, a plant peptide signal involved in the innate immune response. *Peptides* 29, 2083-2089.

Pechan, T., Cohen, A., Williams, W.P., and Luthe, D.S. (2002). Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13319-13323.

Pechan, T., Ye, L., Chang, Y., Mitra, A., Lin, L., Davis, F.M., Williams, W.P., and Luthe, D.S. (2000). A Unique 33-kD Cysteine Proteinase Accumulates in Response to Larval Feeding in Maize Genotypes Resistant to Fall Armyworm and Other Lepidoptera. *The Plant cell* 99, 13319–13323.

Pefia-Cortes, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E.W., and Willmitzer, L. (1993). Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191, 123 128.

Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J., Manners, J.M., and Broekaert, W.F. (1996). Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis* Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. *The Plant cell* 8, 2309-2323.

Perez-Martin, J., Bardetti, P., Castanheira, S., de la Torre, A., and Tenorio-Gomez, M. (2016). Virulence-specific cell cycle and morphogenesis connections in pathogenic fungi. *Semin Cell Dev Biol*.

Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M., and Cotrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.

Petutschnig, E.K., Jones, A.M., Serazetdinova, L., Lipka, U., and Lipka, V. (2010). The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 285, 28902-28911.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30.

Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology* 5, 308-316.

Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology* 28, 489-521.

R-Core-Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Rakwal, R., Kumar Agrawal, G., and Jwa, N.S. (2001). Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene* 263, 189-198.

Ranf, S. (2016). Immune Sensing of Lipopolysaccharide in Plants and Animals: Same but Different. *PLoS pathogens* 12, e1005596.

Ranf, S., Gisch, N., Schaffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y.A., Sanchez-Carballo, P.M., Zahringer, U., Huckelhoven, R., Lee, J., et al. (2015). A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature immunology* 16, 426-433.

Rate, D.N., and Greenberg, J.T. (2001). The *Arabidopsis* aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *The Plant Journal* 27, 203-211.

Rawlings, N.D., and Morton, F.R. (2008a). The *MEROPS* batch BLAST: a tool to detect peptidases and their non-peptidase homologues in a genome. *Biochimie* 90, 243-259.

Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J., and Barrett, A.J. (2008b). *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 36, D320-325.

Ray, S., Alves, P.C., Ahmad, I., Gaffoor, I., Acevedo, F.E., Peiffer, M., Jin, S., Han, Y., Shakeel, S., Felton, G.W., et al. (2016). Turnabout Is Fair Play: Herbivory-Induced Plant Chitinases Excreted in Fall Armyworm Frass Suppress Herbivore Defenses in Maize. *Plant physiology* 171, 694-706.

Redkar, A., and Doehlemann, G. (2016a). EdU Based DNA Synthesis and Cell Proliferation Assay in Maize Infected by the Smut Fungus *Ustilago maydis*. *bio-protocol* 6.

Redkar, A., and Doehlemann, G. (2016b). *Ustilago maydis* Virulence Assays in Maize. *Bio-protocol* 6, e1760.

Rhoades, M.M. (1984). The Early Years of Maize Genetics. *Ann Rev Genet* 18, 1-29.

Robert-Seilantiz, A., Grant, M., and Jones, J.D.G. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology* 49, 317-343.

Roberts, W.K., and Selitrennikoff, C.P. (1990). Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General Microbiology* 136 1771-1778.

Rohde, A., Morreel, K., Ralph, J., Goeminne, G., Hostyn, V., De Rycke, R., Kushnir, S., Van Doorselaere, J., Joseleau, J.P., Vuylsteke, M., et al. (2004).

Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *The Plant cell* 16, 2749-2771.

Rooney, H.C., van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A., Joosten, M.H., Jones, J.D., and de Wit, P.J. (2005). *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 308, 1783-1786.

Ryan, C., Pearce, G., Scheer, J., and Moura, D. (2002). Polypeptide Hormones. *the Plant Cell Online*, 251-264.

Ryan, C.A., Huffaker, A., and Yamaguchi, Y. (2007). New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cellular microbiology* 9, 1902-1908.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., S., N., and AR., C. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*.

Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T., and Weiler, E.W. (2000). 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* 210, 979-984.

Schimoler-O'Rourke, R., Richardson, M., and Selitrennikoff, C.P. (2001). Zeamatin inhibits trypsin and alpha-amylase activities. *Applied and environmental microbiology* 67, 2365-2366.

Schmidlin, F., and Bunnett, N.W. (2001). Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. *Current Opinion in Pharmacology* 1, 575–582.

Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N.X., Elsasser, S., Finley, D., Dikic, I., Walters, K.J., and Groll, M. (2008). Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature* 453, 548-552.

Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A.K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G., and Chinchilla, D. (2010). Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *The Journal of biological chemistry* 285, 9444-9451.

Selitrennikoff, C.P. (2001). Antifungal proteins. *Applied and environmental microbiology* 67, 2883-2894.

Sethi, A., McAuslane, H.J., Rathinasabapathi, B., Nuessly, G.S., and Nagata, R.T. (2009). Enzyme Induction as a Possible Mechanism for Latex-Mediated Insect Resistance in Romaine Lettuce. *Journal of Chemical Ecology* 35, 190-200.

- Seybold, H., Trempel, F., Ranf, S., Scheel, D., Romeis, T., and Lee, J.** (2014). Ca²⁺signalling in plant immune response: from pattern recognition receptors to Ca²⁺decoding mechanisms. *New Phytologist* 204, 782-790.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintla, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S., and van der Hoorn, R.A.L.** (2008). Fungal effector protein Avr2 targets diversifying defense-related cysteine proteases of tomato. *The Plant cell* 20, 1169-1183.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.F., Sharon, M., Browse, J., et al.** (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468, 400-405.
- Shimodaira, H.** (2006). Hierarchical clustering with P-values via multiscale bootstrap resampling.
- Shindo, T., and van der Hoorn, R.A.** (2008). Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Molecular plant pathology* 9, 119-125.
- Shiu, S.H., and B. Blecker, A.** (2001). Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. *Science*.
- Shpacovitch, V., Feld, M., Bunnett, N.W., and Steinhoff, M.** (2007). Protease-activated receptors: novel PARtners in innate immunity. *Trends in immunology* 28, 541-550.
- Simon French, S., and Robson, B.** (1993). What is a Conservative Substitution? *J Mol Evol* 19, 171-175.
- Sims, A.H., Dunn-Coleman, N.S., Robson, G.D., and Oliver, S.G.** (2004). Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. *FEMS Microbiol Lett* 239, 95-101.
- Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., van der Hoorn, R.A., and Kamoun, S.** (2009). Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 1654-1659.
- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A., and Hawes, C.** (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols* 1, 2019-2025.
- Spoel, S.H.** (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *The Plant Cell Online* 15, 760-770.

Srivastava, R., Liu, J.X., Guo, H., Yin, Y., and Howell, S.H. (2009). Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. *Plant J* 59, 930-939.

Srivastava, R., Liu, J.X., and Howell, S.H. (2008). Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in Arabidopsis. *Plant J* 56, 219-227.

Stegmann, M., Monaghan, J., Smakowska-Luzan, E., Rovenich, H., Lehner, A., Holton, N., Belkhadir, Y., and Zipfel, C. (2017). The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science* 355, 287-289.

Sun, Y., Li, L., Macho, A., Han, Z., Hu, Z., Zipfel, C., Zhou, J., and Chai, J. (2013). Structural Basis for flg22-Induced Activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 Immune Complex. 342.

Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J.K., and Mark Cigan, A. (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature communications* 7, 13274.

Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., and Dong, X. (2008). Plant Immunity Requires Conformational Charges of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* 321, 952-956.

Takken, F.L.W., Albrecht, M., and Tameling, W.I.L. (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 9, 383-390.

Tang, D., Wang, G., and Zhou, J.M. (2017). Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *The Plant cell* 29, 618-637.

Tang, J., Han, Z., Sun, Y., Zhang, H., Gong, X., and Chai, J. (2015). Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. *Cell Res* 25, 110-120.

The Gene Ontology Consortium (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25, 25-29.

Tian, S.P., Yao, H.J., Deng, X., Xu, X.B., Qin, G.Z., and Chan, Z.L. (2007). Characterization and Expression of beta-1,3-Glucanase Genes in Jujube Fruit Induced by the Microbial Biocontrol Agent *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 97, 260-268.

Tierney, L. (2009). snow: Simple Network of Workstations.

Trudel, J., Grenier, J., Potvin, C., and Asselin, A. (1998). Several Thaumatin-Like Proteins Bind to β -1,3-Glucans. *Plant physiology* 118, 1431-1438.

van der Hoorn, R.A. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 59, 191-223.

van der Hoorn, R.A., and Jones, J.D. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr Opin Plant Biol* 7, 400-407.

van der Hoorn, R.A., and Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant cell* 20, 2009-2017.

van der Linde, K., Hemetsberger, C., Kastner, C., Kaschani, F., van der Hoorn, R.A., Kumlehn, J., and Doehlemann, G. (2012a). A maize cystatin suppresses host immunity by inhibiting apoplastic cysteine proteases. *The Plant cell* 24, 1285-1300.

van der Linde, K., Mueller, A., Hemetsberger, C., Kaschani, F., Van der Hoorn, R.A., and Doehlemann, G. (2012b). The maize cystatin CC9 interacts with apoplastic cysteine proteases. *Plant signaling & behavior* 7.

van der Wel, H., and Loeve, K. (1972). Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet -Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth *Eur J Biochem* 31, 221-225.

van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual review of phytopathology* 44, 135-162.

van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L.C., and Pieterse, M.J. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol Biol* 41, 537-549.

Vanacker, H., Lu, H., Rate, D.N., and Greenberg, J.T. (2001). A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 28, 209-216.

Verhage, A., Vlaardingerbroek, I., Raaymakers, C., Van Dam, N.M., Dicke, M., Van Wees, S.C., and Pieterse, C.M. (2011). Rewiring of the Jasmonate Signaling Pathway in *Arabidopsis* during Insect Herbivory. *Front Plant Sci* 2, 47.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology* 47, 177-206.

Wallace, R.J. (2007). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society* 63, 621-629.

Wan, J., Zhang, S., and Stacey, G. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin. *Molecular plant pathology* 5, 125-135.

Wang, J., Li, H., Han, Z., Zhang, H., Wang, T., Lin, G., Chang, J., Yang, W., and Chai, J. (2015). Allosteric receptor activation by the plant peptide hormone phytosulfokine. *Nature* 525, 265-268.

Wang, L., Wang, S., and Li, W. (2012). RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics* 28, 2184-2185.

Wang, Z.Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., and Chory, J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410, 380-383.

Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562-565.

Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., Newman, M., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J., Cullimore, J.V., et al. (2011). Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19824–19829.

Wu, C.H., Krasileva, K.V., Banfield, M.J., Terauchi, R., and Kamoun, S. (2015). The “sensor domains” of plant NLR proteins: more than decoys? *Front Plant Sci* 6.

Wu, Y., and Zhou, J.M. (2013). Receptor-like kinases in plant innate immunity. *Journal of integrative plant biology* 55, 1271-1286.

Wyrsh, I., Dominguez-Ferreras, A., Geldner, N., and Boller, T. (2015). Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in Arabidopsis fls2 mutants. *The New phytologist* 206, 774-784.

Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R., and Lamb, C. (2004). An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. *EMBO J* 23, 980–988.

Xie, Y.R., Raruang, Y., Chen, Z.Y., Brown, R.L., and Cleveland, T.E. (2015). ZmGns, a maize class I beta-1,3-glucanase, is induced by biotic stresses and possesses strong antimicrobial activity. *Journal of integrative plant biology* 57, 271-283.

Yamada, K., Yamaguchi, K., Yoshimura, S., Terauchi, A., and Kawasaki, T. (2017). Conservation of chitin-induced MAPK signaling pathways in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*

Yamaguchi, Y., and Huffaker, A. (2011). Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 14, 351-357.

Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A.C., Tax, F.E., and Ryan, C.A. (2010). PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in Arabidopsis. *The Plant cell* 22, 508-522.

Yamaguchi, Y., Pearce, G., and Ryan, C.A. (2006). The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10104-10109.

Yan, J., Yuan, S.S., Jiang, L.L., Ye, X.J., Ng, T.B., and Wu, Z.J. (2015). Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology* 99, 4961-4981.

Yan, Y., Borrego, E., and V, M. (2013). Jasmonate Biosynthesis, Perception and Function in Plant Development and Stress Responses.

Yang, J., Kloepper, J.W., and Ryu, C.M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science* 14, 1-4.

Zavasnik-Bergant, T., and Turk, B. (2006). Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens* 67, 349-355.

Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in immunology* 35, 345-351.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125, 749-760.

Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428, 764-767.

6 Anhang

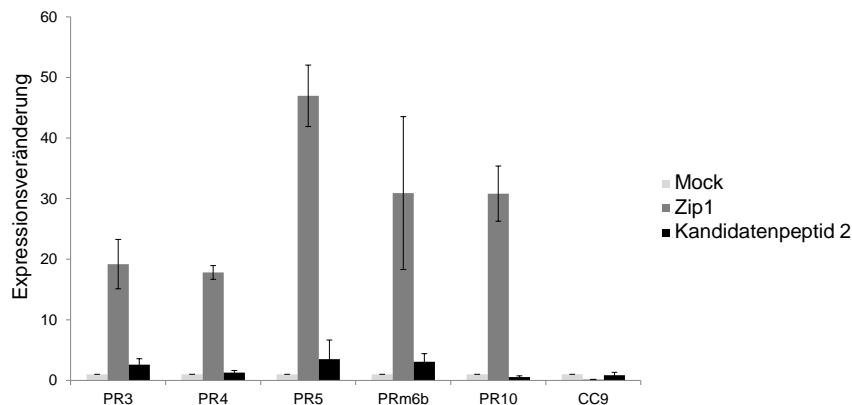


Abb. S1. qRT-PCR Analyse von Zip1 und Kandidatenpeptid 2 als eines der in apoplastischem Fluid SA-behandelter Pflanzen identifizierten Peptide. Kandidatenpeptid 2 induziert keine *PR*-Genexpression.

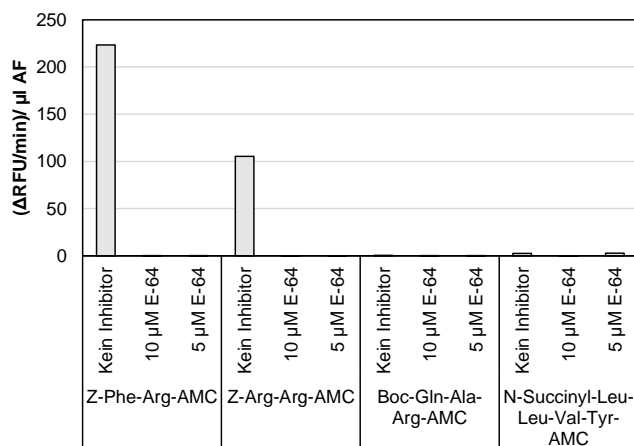


Abb. S2. PLCP-Aktivitätstest mit unterschiedlichen Substraten. In der Ab- und Anwesenheit von E-64 wurde die Proteaseaktivität in apoplastischen Fluid SA-behandelter Pflanzen mit vier Substraten gemessen, von denen Z-Phe-Arg-AMC und Z-Arg-Arg-AMC am effizientesten geschnitten werden.

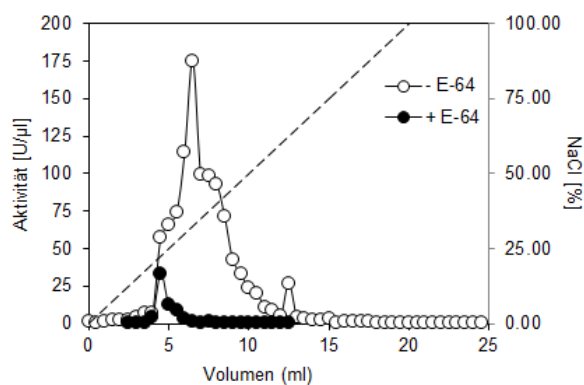


Abb. S3. Das Proteom von apoplastischem Fluid SA-behandelter Pflanzen wurde mittels Anionen-Austausch-Chromatographie aufgetrennt. Anschließend wurde unter Einsatz des Substrats Z-Phe-Arg-AMC die Proteaseaktivität in jeder Fraktion gemessen. Fraktionen mit hoher PLCP-Aktivität wurden vereinigt. So wurden aktive PLCPs für Prozessierungsexperimente ankonzentriert.



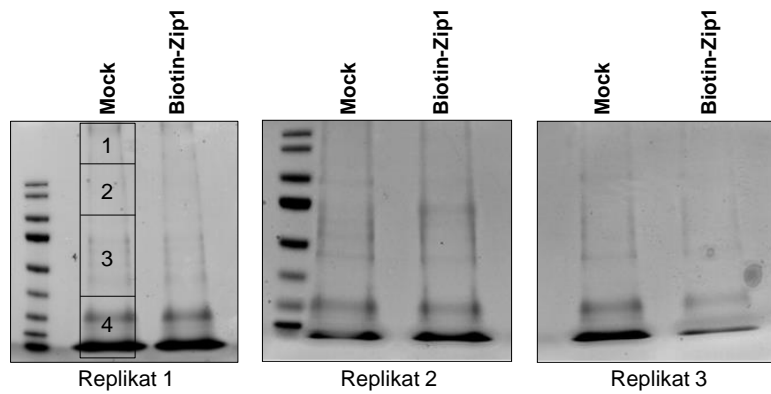


Abb. S5. SDS-PAGE der über Neutravidin immunopräzipitierten Maisproteine nach Biotin-Zip1-Behandlung. Gezeigt sind drei biologische Replikate der gleichen IPs. Jede Spur wurde für die massenspektrometrische Analyse in vier Molekulargewichtsfractionen aufgeteilt und analysiert.

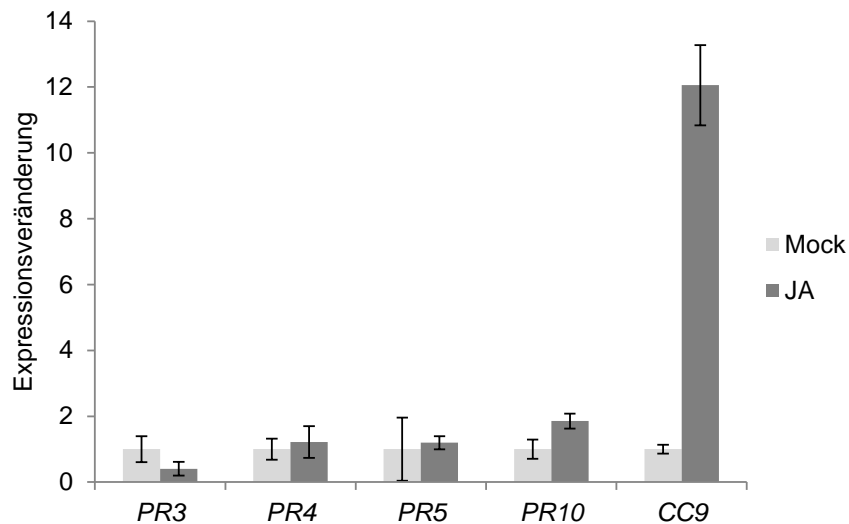
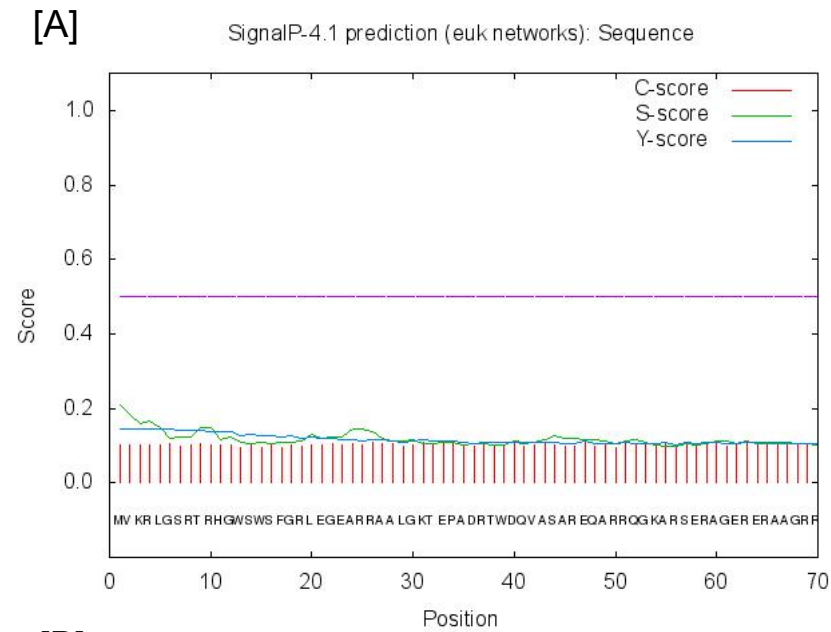


Abb. S6. qRT-PCR Analyse JA-behandelter Pflanzen. Die Behandlung von 2 mM JA induziert die Expression des bekannten Mais JA-Markergens CC9 (van der Linde *et al.*, 2012). Eine Induktion SA-assoziiierter *PR*-Genexpression ist nicht zu verzeichnen.



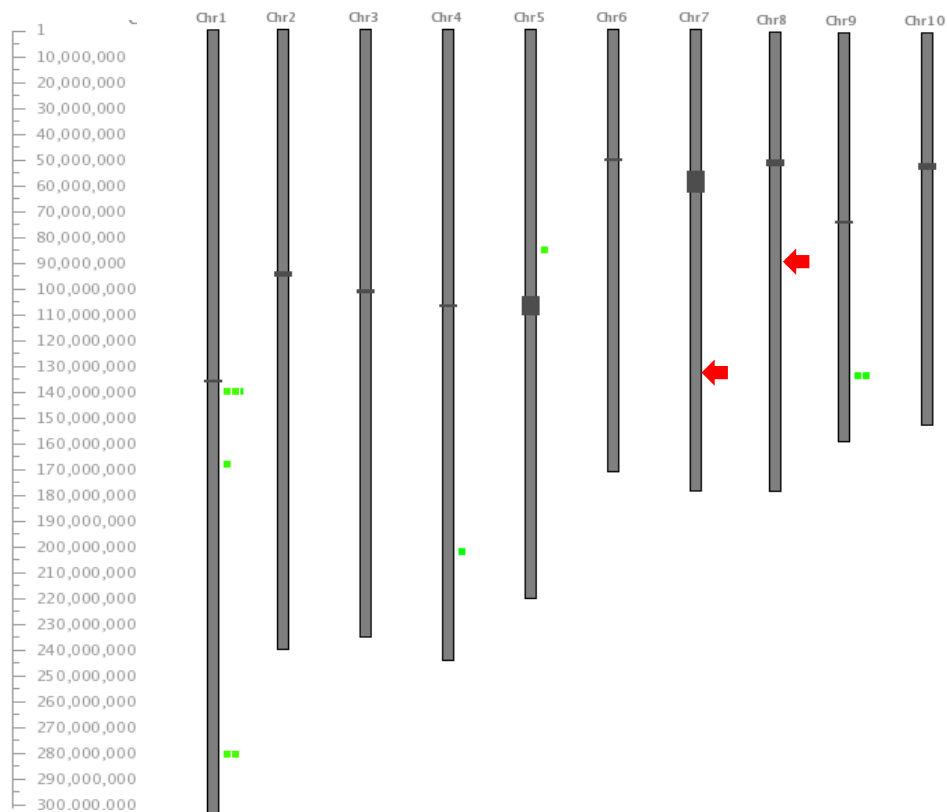
[B]

SecretomeP 2.0a Predictions

# Name	NN-score	Odds	Weighted	Warning
#			by prior	
# =====				
Sequence	0.841	4.288	0.009	-
# =====				

Abb. S7. Die Aminosäuresequenz von PROZIP1 wurde mittels SignalP (v4.1) und SecretomeP (v2.0) analysiert. [A] SignalP Analyse; für PROZIP1 konnte kein Signalpeptid für eine konventionellen Sekretion vorhergesagt werden. [B] SecretomeP Analyse; der NN-Score über einem Wert von 0.6 und keiner Vorhersage eines Signalpeptids deutet auf eine mögliche unkonventionelle Sekretion.

[A]



[B]

```

PROZIP1      1  MVKRLGSRTRHGWSWSFGRLEGEARRAALGKTEPADRTWDQVASAREQARRQGKARSERA
PROZIP2      1  GWSWSFGRLEGEARRAALGKTEPADRTWDQVASAREQARRQGKARSERA

PROZIP1      61  GERERAAGRREIQAPSVEFRRAARQPWEGESELKLATQGASVRRNRTGTQGEEEGDAVAQ
PROZIP2      61  RERERAAGRREIQAPSVEFRRAARQPWEGESELKLATQGVSVRRNRTGTQGEEEGDAVAQ

PROZIP1     121  EDGWAEEDRGERRLDF
PROZIP2     121  EDGWAEEDRGERRLDF

```

[C]

Name	Chromosom	MaizeGDB	Peptidsequence
PROZIP1	7	AC210027.3_FG003	EGESELKLATQGA ^A SVRR
PROZIP2	8	GRMZM2G140153	EGESELKLATQGV ^V SVRR

Abb. S8. [A] Durch MaizeGDB Blast-Analyse konnte eine Genkopie von PROZIP1 auf Chromosom 8 identifiziert werden (PROZIP2; GRMZM2G140153) (rote Pfeile). Grüne zeigen sehr schwach ähnliche Sequenzen zu PROZIP1. [B] Aminosäuresequenz Vergleich von PROZIP1 und PROZIP2. [C] Zusammengefasste Information über PROZIP1 und PROZIP2 mit Chromosomenlokalisierung, MaizeGDB Identifikationsnummer und Peptidsequenz.

Name	Experiment	Probe	Peptide	Score	MaizeGDB
Kandidaten-peptid 1 (Zip1)	1	control	EGESELKLTQGASVRR	44	AC210027.3_FGP003
		SA	EGESELKLTQGASVRR	37	
	2	control	-	-	
		SA	EGESELKLTQGASVRR	68	
Kandidaten-peptid 2	1	control	-	-	GRMZM2G050131
		SA	IFDDGGFGEVH IFDDGGFGEVHADP	56 56	
	2	control	IFDDGGFGEVHADP	64	
		SA	FDDGGFGEVH IFDDGGFGEVHAD IFDDGGFGEVHADP	56 56 56	
Kandidaten-peptid 3	1	control	-	-	GRMZM2G343543
		SA	TVAVGVIKSVE QTVAVGVIKSVE	51 51	
	2	control	TVAVGVIKSVE QTVAVGVIKSVE	38 38	
		SA	VAVGVIKSVE TVAVGVIKSVE QTVAVGVIKSVE	53 53 53	
Kandidaten-peptid 4	1	control	LETDPVLNK	35	GRMZM2G346757
		SA	LETDPVLNK	44	
	2	control	-	-	
		SA	LETDPVLNK	44	

Tab. S1. Liste der ausgewählten Kandidatenpeptide, die mittels Massenspektrometrie in SA-behandeltem, apoplastischem Fluid identifiziert wurden.

#	Echtes Signal?	Rezeptor?	Identifikationsnummer	Molekulargewicht	1	2	3	1	2	3	Replikat
					Zip1	Zip1	Zip1	Mock	Mock	Mock	
					8	10	12	7	9	11	Probe
1	WAHR	Ja	GRMZM2G177570_P01	117 kDa	0	2	0	0	0	0	ZIPR1
2	WAHR	N/A	CYF_MAIZE (+1)	36 kDa	0	0	11	0	0	0	
3	WAHR	N/A	GRMZM2G111014_P01	80 kDa	1	4	2	0	0	0	
4	WAHR	N/A	B6SJF9_MAIZE (+2)	13 kDa	0	0	5	0	0	0	
5	WAHR	N/A	B6SZC8_MAIZE (+1)	24 kDa	0	0	5	0	0	0	
6	WAHR	N/A	B4FAE5_MAIZE (+2)	63 kDa	0	0	3	0	0	0	
7	WAHR	N/A	GRMZM2G174984_P01	13 kDa	0	0	3	0	0	0	
8	WAHR	N/A	B4FRR1_MAIZE (+1)	32 kDa	0	0	6	0	0	0	
9	WAHR	N/A	B6TYZ1_MAIZE (+1)	24 kDa	0	0	4	0	0	0	
10	WAHR	N/A	GRMZM2G162233_P01 (+1)	20 kDa	0	0	2	0	0	0	
11	WAHR	N/A	gij670366790 ref XP_008664806.1	98 kDa	3	0	2	0	0	0	
12	WAHR	N/A	GRMZM2G180418_P01 (+1)	84 kDa	1	2	0	0	0	0	
13	WAHR	N/A	B6TMS2_MAIZE	18 kDa	0	2	2	0	0	0	
14	WAHR	N/A	B4FLP0_MAIZE (+2)	42 kDa	1	0	4	0	0	0	
15	WAHR	N/A	GRMZM2G039996_P02	27 kDa	0	0	4	0	0	0	
16	WAHR	N/A	GRMZM5G831399_P01	8 kDa	0	0	2	0	0	0	
17	WAHR	N/A	B6T681_MAIZE (+1)	43 kDa	0	1	2	0	0	0	
18	WAHR	N/A	GRMZM2G035503_P01	84 kDa	0	0	3	0	0	0	
19	WAHR	N/A	GRMZM2G034152_P01 (+2)	56 kDa	0	0	2	0	0	0	
20	WAHR	N/A	GRMZM2G137648_P01 (+3)	70 kDa	0	0	3	0	0	0	
21	WAHR	N/A	gij255038462 ref YP_003089083.1	127 kDa	1	4	0	0	0	0	
22	WAHR	N/A	GRMZM2G074790_P02	60 kDa	4	0	0	0	0	0	
23	WAHR	N/A	GRMZM2G013607_P02	21 kDa	2	0	0	0	0	0	
24	WAHR	N/A	AC218998.2_FGP001 (+1)	56 kDa	0	2	1	0	0	0	
25	WAHR	N/A	GRMZM2G117357_P01 (+1)	79 kDa	0	2	1	0	0	0	
26	WAHR	N/A	GRMZM5G896082_P04	36 kDa	0	0	2	0	0	0	
27	WAHR	N/A	gij670366201 ref XP_008664557.1	92 kDa	0	2	0	0	0	0	
28	WAHR	N/A	CYB6_MAIZE (+2)	24 kDa	0	0	2	0	0	0	
29	WAHR	N/A	GRMZM2G094768_P01	61 kDa	1	2	1	0	0	0	
30	WAHR	N/A	GRMZM2G177668_P01	60 kDa	3	0	0	0	0	0	
31	WAHR	N/A	AC218998.2_FGP011	88 kDa	0	2	0	0	0	0	
32	WAHR	N/A	A7KVC2_MAIZE	167 kDa	1	0	2	0	0	0	
33	WAHR	N/A	C4J5P0_MAIZE (+1)	50 kDa	1	0	2	0	0	0	
34	WAHR	N/A	GRMZM2G047720_P01	16 kDa	0	0	3	0	0	0	
35	WAHR	N/A	B4FVG9_MAIZE (+2)	30 kDa	0	0	2	0	0	0	
36	WAHR	N/A	GRMZM2G068316_P01 (+1)	25 kDa	0	0	2	0	0	0	
37	WAHR	N/A	B6SX11_MAIZE (+1)	15 kDa	0	0	2	0	0	0	
38	WAHR	N/A	gij670411776 ref XP_008647026.1	26 kDa	1	2	0	0	0	0	
39	WAHR	N/A	GRMZM2G417682_P02 (+4)	118 kDa	0	2	2	0	0	0	
40	WAHR	N/A	B6TY98_MAIZE	24 kDa	0	0	3	0	0	0	
41	WAHR	N/A	gij670398736 ref XP_008679390.1	73 kDa	0	0	3	0	0	0	
42	WAHR	N/A	gij670419520 ref XP_008650545.1	56 kDa	0	2	0	0	0	0	
43	WAHR	N/A	gij670447502 ref XP_008663941.1	45 kDa	1	2	0	0	0	0	
44	WAHR	N/A	B7ZX48_MAIZE (+1)	58 kDa	0	3	0	0	0	0	
45	WAHR	N/A	gij670396319 ref XP_008678450.1	113 kDa	0	2	0	0	0	0	
46	WAHR	N/A	GRMZM2G016677_P01	27 kDa	0	0	2	0	0	0	
47	WAHR	N/A	C0P5R1_MAIZE (+1)	45 kDa	0	0	2	0	0	0	
48	WAHR	N/A	gij255034578 ref YP_003085199.1	129 kDa	2	0	1	0	0	0	
49	WAHR	N/A	GRMZM2G057642_P02 (+1)	38 kDa	0	1	2	0	0	0	
50	WAHR	N/A	AC183932.3_FGP007 (+1)	76 kDa	1	0	2	0	0	0	
51	WAHR	N/A	GRMZM2G179797_P01 (+1)	32 kDa	2	0	0	0	0	0	
52	WAHR	N/A	B4FZ11_MAIZE	37 kDa	0	2	0	0	0	0	
53	WAHR	N/A	gij670427072 ref XP_008654217.1	39 kDa	0	2	0	0	0	0	
54	WAHR	N/A	gij670386819 ref XP_008674072.1	33 kDa	2	0	0	0	0	0	
55	WAHR	N/A	GRMZM2G048297_P01	62 kDa	0	2	0	0	0	0	
56	WAHR	N/A	GRMZM2G154652_P01	53 kDa	2	1	0	0	0	0	
57	WAHR	N/A	B6TJV7_MAIZE	30 kDa	2	0	0	0	0	0	
58	WAHR	N/A	GRMZM2G028713_P01	123 kDa	0	2	0	0	0	0	
59	WAHR	N/A	gij670405464 ref XP_008644390.1	22 kDa	0	0	2	0	0	0	
60	WAHR	N/A	GRMZM2G001160_P01	70 kDa	2	0	0	0	0	0	
61	WAHR	N/A	GRMZM2G398057_P01	12 kDa	0	0	2	0	0	0	
62	WAHR	N/A	gij255039202 ref YP_003089823.1	25 kDa	0	0	2	0	0	0	
63	WAHR	N/A	B6TF40_MAIZE (+1)	19 kDa	2	0	0	0	0	0	
64	WAHR	N/A	GRMZM2G460371_P01	27 kDa	2	0	0	0	0	0	
65	WAHR	N/A	gij255036821 ref YP_003087442.1	37 kDa	2	0	0	0	0	0	
66	WAHR	N/A	gij255037827 ref YP_003088448.1	22 kDa	0	2	0	0	0	0	
67	WAHR	N/A	gij670419586 ref XP_008650581.1	32 kDa	0	2	0	0	0	0	
68	WAHR	N/A	GRMZM2G443447_P01 (+1)	173 kDa	0	2	0	0	0	0	
69	WAHR	N/A	GRMZM2G174797_P01 (+1)	37 kDa	0	2	0	0	0	0	
70	WAHR	N/A	GRMZM2G047298_P01	42 kDa	0	2	0	0	0	0	
71	WAHR	N/A	GRMZM2G111611_P01	25 kDa	0	2	0	0	0	0	
72	WAHR	N/A	GRMZM2G157018_P01	20 kDa	0	0	2	0	0	0	
73	WAHR	N/A	B6TQ25_MAIZE (+2)	51 kDa	0	0	2	0	0	0	
74	WAHR	N/A	Q7X846_MAIZE	10 kDa	0	2	0	0	0	0	
75	WAHR	N/A	GRMZM2G388574_P01	36 kDa	0	2	0	0	0	0	
76	WAHR	N/A	GRMZM2G331764_P01	13 kDa	0	0	2	0	0	0	
77	WAHR	N/A	GRMZM2G064328_P01	55 kDa	0	0	2	0	0	0	
78	WAHR	N/A	B6ST51_MAIZE (+1)	61 kDa	0	0	2	0	0	0	
79	WAHR	N/A	B6U8C5_MAIZE (+3)	62 kDa	0	0	2	0	0	0	
80	WAHR	N/A	GRMZM5G826724_P01	19 kDa	0	0	2	0	0	0	
81	WAHR	N/A	gij670440156 ref XP_008660387.1	24 kDa	2	0	0	0	0	0	
82	WAHR	N/A	B4FX60_MAIZE	19 kDa	0	2	0	0	0	0	
83	WAHR	N/A	GRMZM2G388585_P01 (+1)	99 kDa	0	0	2	0	0	0	
84	WAHR	N/A	gij670363623 ref XP_008656048.1	71 kDa	0	0	2	0	0	0	
85	WAHR	N/A	GRMZM2G071206_P01	102 kDa	0	2	0	0	0	0	
86	WAHR	N/A	GRMZM2G174716_P02	44 kDa	2	0	0	0	0	0	
87	WAHR	N/A	GRMZM2G144635_P01	26 kDa	0	2	0	0	0	0	
88	WAHR	N/A	gij670433368 ref XP_008657173.1	49 kDa	0	0	2	0	0	0	
89	WAHR	N/A	gij255035167 ref YP_003085788.1	65 kDa	2	0	0	0	0	0	

Tab. S2. Liste der Proteine, die bei Biotin-Zip1 Co-IP Experimenten identifiziert wurden. Gezeigt sind Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle nur in Biotin-Zip1 Probe vorkamen. Der Rezeptorkandidat ZIPR1 ist grün hinterlegt.

Abgrenzung der Eigenleistung

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden von mir selbstständig und ohne andere als die hier aufgeführte Hilfe durchgeführt. Dabei erfolgte die Konzipierung der Experimente in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gunther Döhlemann. Im Folgenden werden weitere an dieser Arbeit beteiligte Personen sowie ihre experimentellen Beiträge genannt:

Dr. Fanusch Kaschani

führte die in Kapitel 2.2 beschriebenen massenspektrometrischen Analysen durch. Ebenso erfolgte durch ihn der anschließende Abgleich der Daten mit dem Maisproteom zur Identifizierung möglicher Peptidkandidaten sowie derer Vorläuferproteine.

Dr. Karina van der Linde

isolierte das in Kapitel 2.2 beschriebene apoplastische Fluid SA-behandelter Blätter, in denen das Peptid Zip1 identifiziert werden konnte. Außerdem war sie maßgeblich an der Auswahl der in Tab. S1 gezeigten Kandidatenpeptide beteiligt und brachte zu Anfang des Projekts Ideen zu diesem ein.

Beyda Acar

behandelte im Rahmen ihrer Bachelorarbeit Maispflanzen mit Salicylsäure, isolierte apoplastisches Fluid, und führte PROZIP1-Prozessierungsexperimente durch, die zur Anfertigung von Abb. 11B führten.

Dr. Urs Lahrmann

war an der in Kapitel 2.5.1 gezeigten Auswertung der RNAseq-Daten beteiligt. Er führte das Mapping und die Analyse durch und fertigte die Abbildungen 14A, 14B, sowie S4 an.

Prof. Dr. Eric Schmelz und Dr. Yezhang Ding

analysierten unbehandelte, Mock- und Zip1-behandelte Maisblätter und quantifizierten den freien SA-Gehalt, was zur Anfertigung von Abb. 16A führte.

Lebenslauf

Sebastian Ziemann

geboren am 26. August 1987 in Attendorn, Deutschland

Akademische Laufbahn

Promotion seit 12/2014	Universität zu Köln Fortsetzung der Doktorarbeit an der Universität zu Köln Abteilung für Terrestrische Mikrobiologie, Prof. Gunther Döhlemann
10/2012 – 10/2014	Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg Abteilung für organismische Interaktionen, AG Gunther Döhlemann
Auslandsaufenthalt 08/2014-11/2014	The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK Mitarbeiter im Labor von Prof. Dr. Cyril Zipfel als „Visiting Student Researcher“
Masterstudium 10/2010 – 06/2012	Academic Master of Science (M.Sc.) in “Molecular and Cellular Biology” an der Philipps-Universität Marburg, Deutschland Titel der Masterarbeit: Heterologe Expression und funktionelle Charakterisierung von Cysteinproteasen aus <i>Zea mays</i>
Bachelorstudium 10/2007 – 06/2010	Academic Bachelor of Science (B.Sc.) in Biologie an der Philipps-Universität Marburg, Deutschland Titel der Bachelorarbeit: Funktionelle Charakterisierung des <i>Ustilago maydis</i> Effektorproteins Pep1
Schul Ausbildung 08/1998- 06/2007	Albert-Schweitzer-Gymnasium in Plettenberg, Deutschland Abitur